

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VIVIANA STEPHANIE COSTA GAGOSIAN

**ESTUDO DA AÇÃO CICATRIZANTE DA PELE GERADO PELO COMPLEXO NATURAL
ALTAMENTE DILUÍDO M1**

CURITIBA

2016

VIVIANA STEPHANIE COSTA GAGOSIAN

**ESTUDO DA AÇÃO CICATRIZANTE DA PELE GERADO PELO COMPLEXO NATURAL
ALTAMENTE DILUÍDO M1**

Monografia apresentada como requisito parcial
à conclusão do Curso de Ciências Biológicas-
Bacharelado, Setor de Ciências biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dra. Carolina Camargo de
Oliveira*

Coorientadora: Jenifer Pendiuk Gonçalves*

*Departamento de Biologia Celular, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

CURITIBA

2016

AGRADECIMENTOS

A mis padres, Carlos y Susy, que siempre me apoyaron en todas mis decisiones, siendo una de ellas la decisión de este curso fantástico que es la biología, que vibraron conmigo cuando pase en el vestibular. Mismo mi madre no pudiendo estar conmigo en esta etapa de mi vida le agradezco a ella y a mi padre, por todos los consejos, cariño y amor que me dieron, porque todo lo que he conquistado fue principalmente por todo el apoyo y soporte que me dieron, los quiero mucho.

A professora Caro, por realmente me orientar antes e durante a monografia, por ter me explicado coisas que não via, com muita paciência, por ter me suportado mandando mensagens com perguntas nos fins de semana, feriados e à noite. Pela atenção que sempre me dedicou, por ter me ajudado dentro e fora do laboratório, até mesmo antes de ser sua orientada e pelas muitas risadas em momentos de descontração.

A mi hermano Carlitos, a mi Abuela Rosa, a mis tías Flávia y Mary, a mis tíos Panos y Samuel, a mis primos Nataly y Gustavo, a mis padrinos Rúben y Cristina y a mi cuñada Patricia, por haber estado siempre a mi lado en los momentos difíciles apoyándome. Les agradezco, pues siempre me dieron buenos consejos, fueron muy pacientes, comprensivos y me supieron entender cuando no podía ir a fiestas de familia por tener que estudiar o hacer algún trabajo de facultad, los quiero mucho.

A Je por ter sido uma ótima amiga e coorientadora mesmo antes de ser oficialmente minha coorientadora. Obrigada por sempre ter me ajudado, ter tido muita paciência e ter me ensinado tudo o que foi realizado nesta monografia e no laboratório. Por ser séria e descontraída ao mesmo tempo e pelas muitas risadas. Mesmo quando você tinha mil coisas para fazer sempre tinha tempo para me ajudar e responder minhas dúvidas. Quando crescer quero ser igual a você.

A Mallu que sempre me apoiou e se tornou uma das minhas melhores amigas dentro e fora do laboratório, que me fez conhecer esse grupo incrível de pesquisadores. Obrigada por sempre estar ao meu lado me ajudando muito em tudo, por me dar força e me incentivar sempre, pelos ótimos conselhos de experimentos e de vida, por me fazer dar muitas risadas até mesmo quando “brigamos”, por dançar comigo todos os dias na volta para casa, enfim por todos os momentos vividos.

Ao Gustavo e ao Daniel por instalarem diversos programas uteis para analises dos resultados, no meu computador e por serem sempre descontraídos e alegres.

A Ana por sempre me receber com “Buenas tardes”, quando chego no laboratório e por sempre me ajudar quando tive dúvidas básicas de cálculos e anticorpos.

A Maíra pelas altas risadas e por me incentivar a continuar em frente, sempre vou ser uma Umpa Lumpa.

A todo o pessoal que passou ou ainda está no laboratório (LIPS e LCIN) que contribuíram de alguma maneira na minha formação, adoro a companhia de todos vocês, e aos outros professores do nosso grupo, Edvaldo e Célia, por estarem sempre dando sugestões e dispostos a ajudar.

A minha Maninha Munuzinha e a minha amiga Paloma que estiveram do meu lado durante toda a graduação (Munizinha desde o ensino médio), obrigada por sempre me apoiarem e confiarem em mim, por todas as alegrias que vocês me proporcionaram dentro e fora da faculdade, amo vocês suas lindas.

Aos meus amigos Alana, Alição, Anne, Bruna Aline, Bruna Luz, Bruno, Carol, Cléo, Fran, Gui, Johnathan, Karla, Luzianna, Mariana, Tabata, Thais, Thay, Will, que sempre me incentivaram, chorando, gritando, dançando e comemorando junto comigo. Amo todos vocês.

A banca avaliadora, Prof^a Dra. Daniela Morais Leme e Prof^a Dra. Fernanda Fogagnoli Simas Tosin, por aceitarem corrigir minha monografia.

A Farmácia de Manipulação Homeoterápica, pela confecção e doação de todos os medicamentos utilizados neste trabalho.

A Prof^a Dra. Lucelia Donatti e as alunas dela, por nos permitir usar o mixer (Tissue Ruptor - Fow low, Qiagen[®] – 2006), o pHmetro e o leitor de microplacas Epoch Microplate Spectrophotometer.

Ao Prof. Dr Marcelo de Meira Santos Lima, por nos permitir utilizar o aparelho AmershamTM Imager 600 da General Electric[®] e aos alunos dele que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Ao Prof. Dr. Francisco Filipak Neto, por nos permitir usar o microscópio invertido, e as alunas dele por me ensinarem a mexer e a fotografar no microscópio invertido e por me disponibilizarem uma chave para que eu pudesse ir a qualquer horário.

Ao Prof Dr Sílvio Sanches Veiga e aos alunos dele por sempre nos permitirem pegar gelo.

A todos os professores, que me deram aula no curso de ciências biológicas noturno, pois todos contribuíram com a minha formação e todo conhecimento adquirido me ajudou a realizar esta monografia.

A Universidade Federal do Paraná, a todos os servidores e funcionários que me forneceram um ambiente agradável e oportunidade de realizar o curso de Ciências Biológicas à noite.

RESUMO

A pele, considerada o maior órgão, reveste a superfície do corpo e protege contra dessecação e agentes externos. É dividida em duas camadas que se sobrepõem: a epiderme (camada não vascularizada) e a derme (camada vascularizada). Após o tecido sofrer uma lesão ele deve ser reparado a fim de manter o órgão saudável, processo que recebe o nome de cicatrização. Esse processo é dinâmico e complexo, envolve mecanismos bioquímicos, fisiológicos e celulares que são exercidos ao mesmo tempo, podendo haver interação entre eles. O processo da cicatrização é dividido em quatro fases. A primeira, chamada hemostase, tem como principal função a formação do coágulo com o objetivo de cessar o sangramento, e também iniciar a defesa. Na sequência inicia-se a fase inflamatória, de maior importância para a cicatrização, cujo principal objetivo é evitar infecções no tecido lesionado. Uma vez iniciada a angiogênese e formação do tecido de granulação inicia-se a fase proliferativa, que se sobrepõe com a fase inflamatória. E por fim, a fase de remodelação é caracterizada por substituir o tecido de granulação por uma cicatriz. O complexo natural altamente diluído (CNAD) utilizado neste trabalho recebe o nome de M1 e é uma combinação de vários compostos de origem animal, vegetal e mineral. O presente trabalho tem como objetivo estudar o mecanismo de ação cicatrizante gerado pelo M1, que justifique a melhora da cicatrização observada anteriormente *in vivo*. Para isso, foram realizados ensaios moleculares, como western blotting, com extrato proteico de pele de camundongo tratados por 3 e 10 dias com gel de M1. Foram avaliadas a expressão de metaloproteinases da matriz (MMP-2 e MMP-9), alfa actina do músculo liso (α -SMA) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Nenhuma das moléculas avaliadas foi diferencialmente expressa após o tratamento com M1. Além disso, foram realizados ensaios *in vitro*, com fibroblastos (Balb/3T3) a fim de verificar a proliferação e funcionalidade celular além da cicatrização *in vitro*. Os ensaios de proliferação celular e cicatrização *in vitro* mostraram que o complexo M1 não é capaz de alterar a proliferação nem a migração de fibroblastos. Já o ensaio de funcionalidade, que foi realizado com o intuito de verificar a citotoxicidade complexo M1 (20%v/v), mostrou que não inviabiliza as células, sendo um medicamento seguro para uso. Concluímos, portanto, que a melhora no processo de cicatrização observado *in vivo* após a utilização do complexo M1 não ocorre através da atuação das moléculas estudadas. Sendo assim, outras moléculas e vias devem ser investigadas a fim de explicar o resultado observado *in vivo*.

Palavras chave: Altas diluições. Cicatrização da pele. Fibroblastos. Matriz extracelular.

ABSTRACT

The skin, considered the largest organ, covers the whole body extension and protects against desiccation and external agents. It is divided into two layers: epidermis (non-vascularized) and dermis (vascularized). After the tissue undergoes an injury it must be repaired to keep the organ healthy, process called wound healing. This process is dynamic and complex and engages biochemical, physiological, and cellular mechanisms that overlap and interact. The healing process is divided into four phases. The first, called hemostasis, where blood clot is formed to prevent further bleeding and starts body defense. Then, the inflammatory phase starts to avoid infections in the injured tissue, being considered the most important phase to wound healing. Angiogenesis and granulation tissue formation starts on proliferative phase, which overlaps with the inflammatory phase. Next, the remodeling phase is characterized by replacing the granulation tissue with a scar. The highly diluted natural complex (HDNC) used in this work is called M1 and is a combination of various compounds of animal, vegetable, and mineral origin. The present work aims to verify the mechanisms underlying the wound healing process generated by M1, which justify its improvement previously observed *in vivo*. Molecular assays, such as western blotting, with protein extract of mouse tissue treated for 3 and 10 days with M1 gel. The expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9), smooth muscle alpha actin (α -SMA), and vascular endothelial growth factor (VEGF) were evaluated. No significant changes on these protein expressions were found after treatment. In addition, *in vitro* assays were performed with fibroblasts (Balb/3T3) to verify cell functionality and proliferation, as well as wound healing. The *in vitro* cell proliferation and wound healing assays showed that M1 complex (20%v/v) is not capable of changing cell proliferation or fibroblast migration. Os ensaios de proliferação celular e cicatrização *in vitro* mostraram que o complexo M1 não é capaz de alterar a proliferação nem a migração de fibroblastos. The functionality assay, which aimed to verify M1 cytotoxicity indicated that it is a safe medicine for use. We conclude, therefore, that the improvement in the processes of wound healing observed *in vivo* previously is not due to the molecules studied. Thus other molecules and pathways must be investigated in order to explain the result observed *in vivo*.

Key words: High dilution. Skin wound healing. Fibroblasts. Extracellular matrix.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FECHAMENTO DE FERIDA NA PELE DE CAMUNDONGOS APÓS TRATAMENTO COM M1	13
FIGURA 2- ESTRUTURA DA PELE E ANEXOS	16
FIGURA 3 - FASES DA CICATRIZAÇÃO	18
FIGURA 4 - FIBROBLASTOS MURINOS DA LINHAGEM BALB /3T3	29
FIGURA 5 - ESQUEMA DA ANÁLISE DAS IMAGENS DO ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> . 33	
FIGURA 6 - EXPRESSÃO DE ALFA SMA EM PELE DERIVADA DE LESÃO EXPERIMENTAL POR EXCISÃO EM CAMUNDONGOS	35
FIGURA 7 - EXPRESSÃO DE MMP-2 EM PELE DERIVADA DE LESÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS	39
FIGURA 8 - EXPRESSÃO DE MMP-9 EM PELE DERIVADA DE LESÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS	42
FIGURA 9 - CICATRIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	OBJETIVOS	14
1.1.1	Objetivo geral	14
1.1.2	Objetivos específicos	14
1.2	JUSTIFICATIVA	15
2	REVISÃO	15
2.1	PELE	15
2.2	CICATRIZAÇÃO	17
2.2.1	<i>Fase de Hemostase</i>	18
2.2.2	<i>Fase Inflamatória</i>	19
2.2.3	<i>Fase Proliferativa</i>	21
2.2.4	<i>Fase de Remodelação</i>	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	COMPLEXO M1.....	25
3.2	AMOSTRA DE PELE DE CAMUNDONGOS	26
3.3	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	27
3.4	WESTERN BLOTTING E IMUNOBLOTTING.....	27
3.5	CULTIVO CELULAR.....	29
3.6	FUNCIONALIDADE CELULAR	30
3.6.1	<i>MTT</i>	30
3.6.2	<i>Vermelho neutro</i>	31
3.7	PROLIFERAÇÃO CELULAR	31
3.8	CICATRIZAÇÃO <i>in vitro</i>	32
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34

4.1	Expressão de alfa-SMA.....	34
4.2	Expressão de VEGF.....	36
4.3	expressão de metaloproteinases.....	37
4.3.1	<i>MMP-2</i>	37
4.3.2	<i>MMP-9</i>	41
4.4	CICATRIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	43
4.5	PROLIFERAÇÃO CELULAR	46
4.6	FUNCIONALIDADE CELULAR	47
5	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXOS	58
	ANEXO 1 - PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	58
	ANEXO 2 - PROTOCOLOS PARA WESTERN BLOTTING	58
	ANEXO 3 - PROTOCOLO DE IMUNOMARCAÇÃO DE MMP-2 PARA WESTERN BLOTTING.....	64
	ANEXO 4 - PROTOCOLO DE IMUNOMARCAÇÃO DE MMP-9 PARA WESTERN BLOTTING.....	65
	ANEXO 5 - PROTOCOLO DE IMUNOMARCAÇÃO DE ALFA-SMA PARA WESTERN BLOTTING ..	66
	ANEXO 6 - PROTOCOLO DE IMUNOMARCAÇÃO DE VEGF PARA WESTERN BLOTTING	67
	ANEXO 7 - PROTOCOLO DE IMUNOMARCAÇÃO DE ACTINA PARA WESTERN BLOTTING.....	68
	ANEXO 8 -PROTOCOLO DE IMUNOMARCAÇÃO DE ALFA-TUBULINA PARA WESTERN BLOTTING	69
	ANEXO 9 - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO CEUA/UFPR ...	70

1 INTRODUÇÃO

A homeopatia foi desenvolvida por um médico alemão chamado Christian Friedrich Samuel Hahnemann em 1796. Esse médico postulava que “os remédios só podem curar doenças semelhantes àquelas que eles próprios podem produzir”. Sendo assim, a terapêutica da homeopatia se baseia na “lei da semelhança” e do “uso de doses mínimas ou infinitesimais”. Ele desenvolveu esse método de diluir e dinamizar para evitar efeitos colaterais exacerbados reduzindo assim a toxicidade, através da diluição e liberando a força medicamentosa latente das substâncias, através das dinamizações. (Farmacopeia Homeopática Brasileira, 2011).

No Brasil, a homeopatia chegou no ano 1840 através do médico francês Dr. Benoit Jules Mure. Mesmo o Brasil não possuindo tecnologia para a produção dos medicamentos, as matérias primas utilizadas, como tinturas, minerais e vegetais, eram trazidas, principalmente da Europa, para que os medicamentos homeopáticos pudessem ser produzidos no país. Hoje em dia, esses medicamentos vêm sendo comercializados e utilizados em diversos países pelo mundo todo. (Farmacopeia Homeopática Brasileira, 2011).

Neste trabalho serão utilizadas as denominações para soluções preparadas homeopaticamente constituídas de mais de um ingrediente como complexo natural altamente diluído (CNAD), e como composto natural altamente diluído quando a solução for constituída de apenas um ingrediente, seguindo os termos estabelecidos pelo Grupo Internacional de Pesquisa em Infinitesimal (GIRI). (WAISSE, 2012).

Em diversos trabalhos, assim como em trabalhos realizados por nosso grupo é possível observar que os CNADs apresentam resultados positivos. Nosso grupo de pesquisa vem testando algumas CNADs há alguns anos, no Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas, apresentando resultados positivos. Observou-se que os CNADs apresentam efeito ativador em tratamento *in vitro* de células da linhagem monocítica, que inclui monócitos e macrófagos. Além disso, observou-se também que o complexo natural altamente diluído altera desde o perfil da expressão gênica relacionada com a ativação de macrófagos até a ocorrência de reações celulares que envolvem a ativação da produção de algumas moléculas, realizando assim aumento nas funções imunitárias e modificando a resposta biológica. (LOPES et al., 2006; OLIVEIRA, 2006). Outro trabalho realizado por nosso grupo, cujo tratamento foi com mesmo complexo (M1) utilizado no tratamento da pele, mostrou resultados positivos *in vivo*. O tratamento com M1 foi capaz de aumentar a quantidade de monócitos/ macrófagos, linfócitos B e granulócitos da medula óssea e monócitos e linfócitos B dos linfonodos dos camundongos,

mostrando que este complexo tem ação no sistema imunológico, melhorando a imunidade celular e humoral (OLIVEIRA et al., 2011).

Oliveira (2010) observou a eficácia de 7 compostos altamente diluídos, sendo eles: mercúrio líquido, *Aconitum napellus*, *Arsenicum álbum*, *Atropa belladonna*, *Bryonia Alba*, *Lachesis muta* e *Thuya occidentalis*, que são utilizados na clínica para o tratamento de doenças inflamatórias e infecciosas, a fim de verificar se ocorria liberação *in vitro* de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e anion superóxido (O₂⁻) por macrófagos. O resultado foi promissor, uma vez que todos os compostos altamente diluídos utilizados nesse trabalho modificaram a liberação de espécies reativas e a expressão de marcadores de células da medula óssea. Sendo assim, foi possível observar que esses medicamentos homeopáticos têm ação sobre os macrófagos, ativando-os e promovendo a defesa celular e a redução do estresse oxidativo. Além disso, foi possível observar que esses medicamentos atuam na diferenciação e/ou na proliferação das células da medula óssea.

O primeiro estudo do processo de cicatrização com CNADs do nosso grupo foi realizado por Dieter (2005), em que se observou que os CNADs, cujas tinturas mães eram provenientes de *Aconitum*, *Bryonia*, *Thuya*, *Lachesis* e *Arsenicum*, poderiam ter uma resposta positiva quanto à melhora da cicatrização, já que o medicamento tem a capacidade de modular a ativação de macrófagos e a liberação de citocinas, que são mediadores do sistema imunológico. Além disso, alguns dos mesmos mediadores estão envolvidos no processo de cicatrização. Observou-se mais uma vez resultados positivos *in vivo*, em que o medicamento reduziu a inflamação ao redor da incisão diminuindo a hiperplasticidade e permitindo que o processo de cicatrização ocorresse adequadamente. Além disso, os animais tratados demonstraram o fechamento mais rápido da lesão, e histologicamente observaram-se menos fibroblastos e neovascularização na lesão.

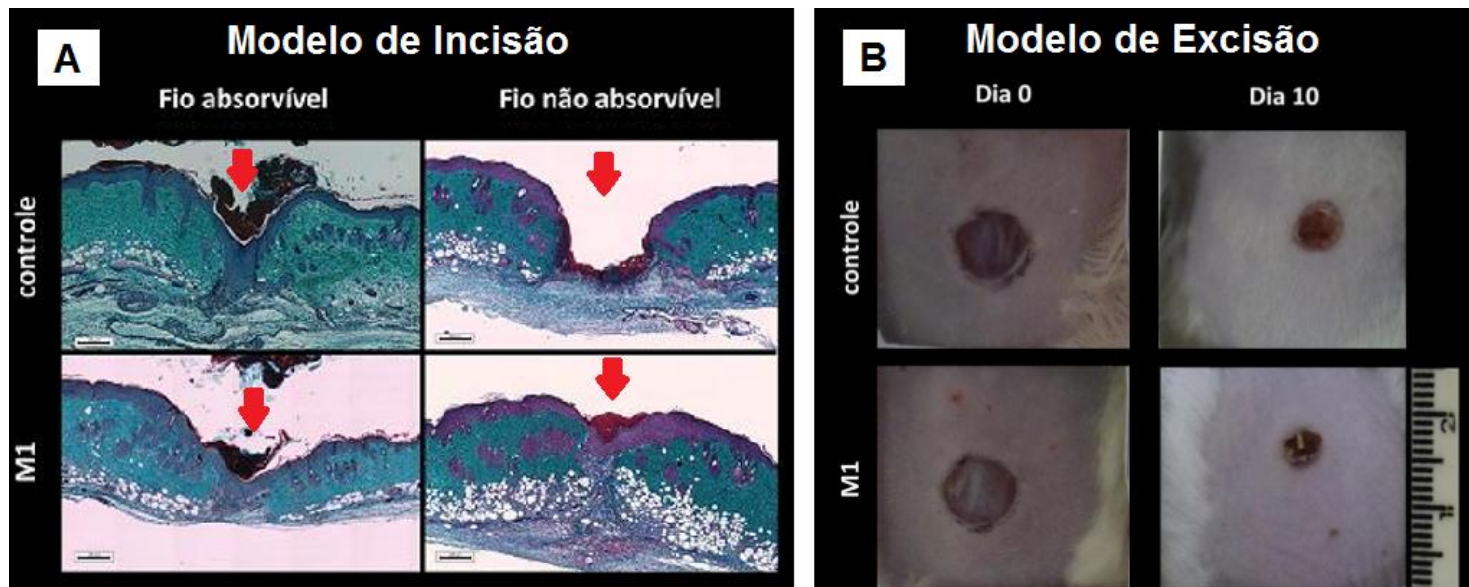
A *Arnica montana* é conhecida por apresentar ações anti-inflamatórias e de cicatrização de tecido. No trabalho de Marzotto e colaboradores (2016) foi analisada a expressão gênica, onde em ensaios *in vitro* foi isolado e sequenciado o RNA total de macrófagos humanos da linhagem THP-1 e também de bibliotecas de cDNA. O composto alterou a expressão de 4 genes contendo domínios conservados semelhantes ao do fator de crescimento epidérmico, dentre os quais aumentou a expressão de 3 genes relacionados com matriz extracelular proteoglicano de heparan sulfato 2 (HSPG2), fibrillina 2 (FBN2), e fibronectina (FN1). Também foi observado aumento da produção de fibronectina através do ensaio de ELISA. No mesmo trabalho foi testado o potencial de cicatrização da *Arnica montana*, através do ensaio de cicatrização *in vitro* mostrando uma maior velocidade no fechamento da ferida.

Por essa razão, é necessário que mais estudos científicos com a utilização de diversos modelos biológicos, *in vivo* e *in vitro*, sejam realizados a fim de verificar a eficácia, a segurança e a

ausência de efeitos colaterais do uso desses medicamentos, denominados complexos e compostos naturais altamente diluídos.

O presente trabalho é uma continuidade do trabalho do nosso grupo, realizado por Gonçalves (2013), que teve por objetivo determinar se o M1, modificava o processo de cicatrização da pele em camundongos utilizando dois modelos, o de incisão suturada com fio absorvível ou não absorvível e o de excisão da pele. O M1 é constituído por substâncias de origem vegetal, mineral e animal, cujos componentes são *Aconitum napellus*, *Arsenicum album*, *Asa foetida*, *Calcareia carbônica*, *Chelidonium majus*, *Cinnamon*, *Conium maculatum*, *Echinacea purpurea*, *Gelsemium sempervirens*, *Ipecacuanha*, *Phosphorus*, *Rhus toxicodendron*, *Silicea*, *Sulphur* e *Thuja occidentalis*. Esse CNAD foi administrado topicamente em forma gel, a fim de verificar se causava efeitos na cicatrização da pele de camundongos. No primeiro modelo, o de incisão, foi realizado uma incisão no dorso do camundongo e esta foi suturada com dois tipos de fio, o absorvível e o não absorvível. Essa lesão foi tratada com gel de M1 por 3 dias consecutivos e foram feitos cortes histológicos. No modelo de excisão da pele, foi retirada uma porção de pele do dorso do camundongo, esta foi tratada com gel de M1 por 10 dias consecutivos e medições foram realizadas durante o tempo de tratamento. Em ambos os modelos foram comparadas as velocidades de fechamento da ferida. Para o modelo de incisão com fio não absorvível, foi possível observar que a incisão tratada com gel de M1 fechou mais rapidamente em comparação com o controle (veículo). O modelo de excisão da pele também obteve resultado positivo. Observou-se que os animais tratados com gel de M1 apresentaram maior velocidade de cicatrização em comparação com os animais controles (FIGURA 1). (GONÇALVES, 2013).

FIGURA 1: FECHAMENTO DE FERIDA NA PELE DE CAMUNDONGOS APÓS TRATAMENTO COM M1.



A- Prancha comparativa das imagens de cortes histológicos da pele de camundongos corados com tricrômico de Gomori após incisão e sutura com fio absorvível ou não absorvível e tratamento com gel (veículo ou M1) por 3 dias consecutivos. As regiões coradas em roxo representam a epiderme e as regiões coradas em verde azulado representam o tecido conjuntivo. A partir dessas imagens de cortes histológicos é possível visualizar que houve um aumento na velocidade de cicatrização, quando suturado com fio não absorvível e tratado com M1 (Aumento digital de 30 x, escala de 200 μ m). As setas vermelhas indicam o local onde a incisão foi realizada. B- Prancha comparativa da área aberta das feridas após excisão de porções circulares de 6 mm de diâmetro da pele. As feridas foram tratadas com M1 ou veículo (controle) por 10 dias consecutivos. As imagens apresentam a mesma escala.

FONTE: Adaptado de GONÇALVES (2013).

Uma vez que o M1 mostrou resultados positivos com relação à cicatrização cutânea, neste trabalho foram investigadas moléculas que poderiam estar envolvidas nesse processo, em amostras controle e tratadas resultantes do modelo de excisão que foram processadas e preservadas anteriormente por Gonçalves (2013). A hipótese é de que há diferenças na expressão de proteínas envolvidas no processo de cicatrização da pele nas amostras tratadas quando comparadas aos controles, explicando assim os resultados observados anteriormente *in vivo*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Verificar possíveis alterações moleculares e funcionais relacionadas a ação cicatrizante, em células presentes na pele e cultivo de fibroblastos (Balb/3T3), após tratamento com o M1, que justifiquem a melhora da cicatrização observada *in vivo* anteriormente por Gonçalves (2013).

1.1.2 Objetivos específicos

Verificar se o tratamento *in vivo* com o M1, após diferentes tempos de tratamento, altera a expressão das seguintes moléculas envolvidas na cicatrização da pele, em células de feridas que foram previamente coletadas e preservadas:

- Dia 3 (fases de hemostase e inflamatória): α – SMA e VEGF.
- Dia 10 (fases proliferativa e de remodelamento): metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) e α – SMA.

Verificar se o tratamento *in vitro* com o M1, por 96 horas, altera os seguintes processos de células de fibroblastos da linhagem Balb/3T3:

- capacidade migratória das células;
- funcionalidades celulares, como atividade mitocondrial e funcionalidade lisossomal.

1.2 JUSTIFICATIVA

Nosso grupo tem desenvolvido muitos projetos com o intuito de avaliar os mecanismos de ação e a modificação da resposta biológica dos compostos e complexos naturais altamente diluídos. É importante estudar os compostos e complexos naturais altamente diluídos, para conhecer como eles agem no organismo, até porque pouco, ou quase nada, se conhece sobre o mecanismo de ação desse tipo de medicamento.

A eficácia dos CNADs vem sendo testados e vem apresentando resultados positivos quanto à modificação da resposta imunológica, permitindo que o próprio organismo responda positivamente a diversas condições patológicas. Pelo CNAD apresentar principalmente a capacidade de modular a ativação de macrófagos e a liberação de citocinas, que são mediadores importantes do sistema imunológico, Gonçalves (2013) testou o M1 frente à cicatrização da pele. Uma vez que a resposta imunológica é um fator importante e está intimamente ligado com o processo cicatricial, a resposta deve ser determinante para que a cicatrização ocorra de forma correta e eficaz.

O estudo da cicatrização é de extrema importância, pois um dos principais desafios no campo da medicina regenerativa é como otimizar a regeneração de tecidos no corpo. Sabe-se que a eficácia do processo de cicatrização depende de diversos fatores que podem potencializar a regeneração do tecido, sendo eles o microambiente da cicatriz, o sistema imunológico, a matriz extracelular (MEC) e as citocinas inflamatórias. (ATALA et al., 2010). Sendo assim, os resultados obtidos por Gonçalves (2013), serviram como base e justificativa para o estudo proposto neste trabalho, pois foram observados resultados positivos *in vivo*, onde o complexo M1 foi capaz de aumentar a velocidade de cicatrização. Foram então realizados ensaios moleculares do material preservado e ensaios *in vitro*, a fim de verificar possíveis candidatos responsáveis pelos efeitos observados *in vivo*.

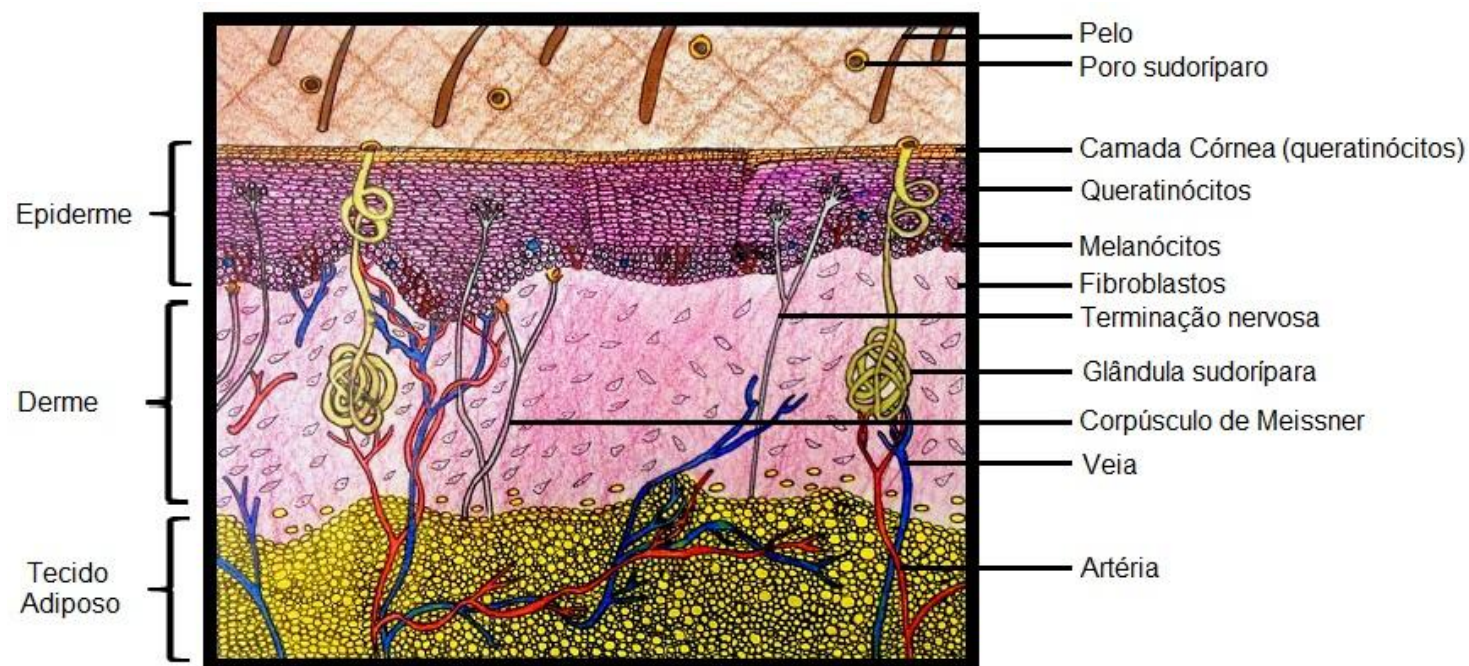
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PELE

A pele é um órgão complexo que reveste a superfície do corpo, sendo considerado o maior órgão do corpo. Ela tem como principal função a proteção contra dessecação e serve como uma barreira protetora, impedindo a entrada de microrganismos. Sendo assim, esse órgão é facilmente

lesionado uma vez que está constantemente sendo atingido por patógenos, radiação UV e por ações que podem causar traumas. (MACLEOD; HAVRAN, 2011). A FIGURA 2 ilustra, de maneira geral, as camadas da pele (epiderme e derme), assim como o tecido adiposo.

FIGURA 2- ESTRUTURA DA PELE E ANEXOS



Estrutura da pele (epiderme + derme) meramente ilustrativa.

FONTE: O autor (2016)

A espessura da pele varia de acordo com o local do corpo em que ela se encontra, sendo dividida estruturalmente em duas camadas que se sobrepõe, sendo elas a epiderme e a derme.

A epiderme é a camada mais externa da pele, e é um epitélio estratificado que se renova com muita frequência. Essa porção da pele não é vascularizada, ou seja, não apresenta vasos sanguíneos nem linfáticos.

Os queratinócitos são o principal tipo celular que a constitui a epiderme. Eles são originários de células tronco da camada basal da epiderme e são deslocados para a superfície, através de processos de diferenciação que envolve diversas modificações morfológicas e bioquímicas. Esse tipo celular é responsável pela produção de queratina. Além disso, há outros dois tipos celulares importantes na epiderme, que são os melanócitos e as células de Langerhans. Os melanócitos têm como principal função a produção de pigmento. Eles encontram-se na camada basal da epiderme na qual produzem a melanina e esse pigmento fica armazenado nos melanossomo. Esse pigmento é transferido aos queratinócitos, protegendo o núcleo dessas células da radiação ultravioleta (UV). (WICKETT;

VISSCHER, 2006, COMBADIERE; LIARD, 2011). As células de Langerhans são células dendríticas do sistema imunitário. (WICKETT; VISSCHER, 2006).

Abaixo da epiderme localiza-se a derme, que é composta por tecido conjuntivo frouxo. A epiderme está conectada a derme pela membrana basal, que é composta por colágeno IV, glicoproteínas estruturais e proteoglicanos.

A derme é a camada da pele vascularizada e possui diversos tipos celulares como: fibroblastos, células imunológicas, células nervosas. (COMBADIERE; LIARD, 2011).

Os fibroblastos que são o tipo celular mais frequente na derme, são responsáveis por sintetizar a membrana basal da epiderme. (COMBADIERE; LIARD, 2011). Além disso, eles são responsáveis pela síntese dos componentes da MEC, sendo eles os colágenos tipos I e III em feixes e fibras elásticas. As fibras de colágeno são responsáveis por conferirem resistência mecânica à pele e as fibras elásticas dão a elasticidade ao tecido. (KANITAKIS, 2002; COMBADIERE; LIARD, 2011;).

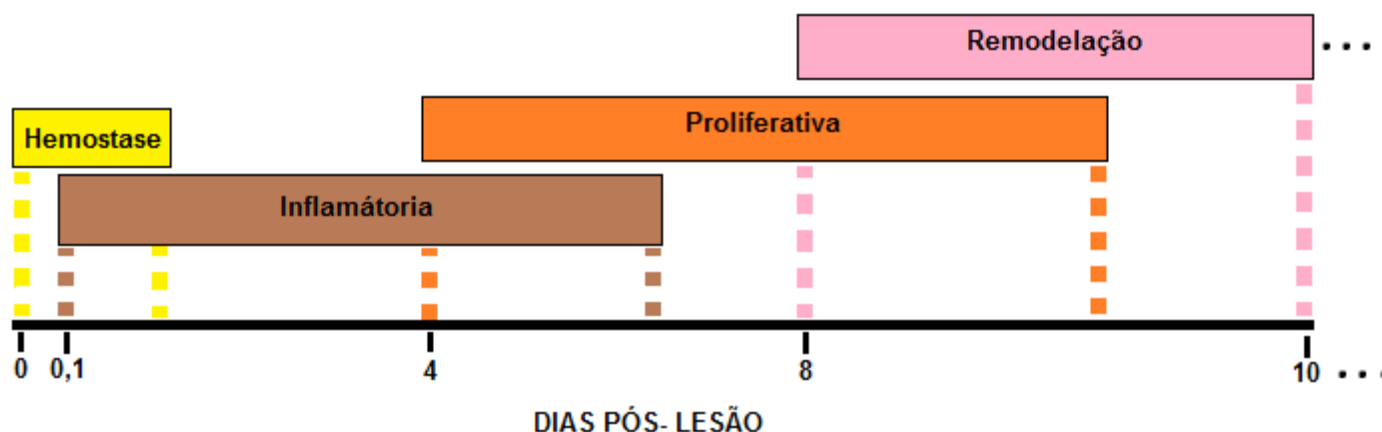
As células nervosas são estruturas sensoriais que são responsáveis pelas percepções táteis e sensoriais. (COMBADIERE; LIARD, 2011;).

Mesmo o tecido apresentando uma grande resistência e estabilidade, seus componentes celulares devem permanecer dinâmicos para permitir a regeneração do tecido, caso ele seja danificado. (SIMPSON; PATEL; GREEN, 2011).

2.2 CICATRIZAÇÃO

Após a pele sofrer lesão ela deve ser reparada para assegurar que o órgão permaneça saudável, processo chamado de cicatrização. O processo de cicatrização é dinâmico e complexo, sendo regulado por mecanismos bioquímicos, fisiológicos e celulares, que interagem entre si para restaurar o tecido danificado. (QIAO et al., 2011). Esses mecanismos são divididos em fases que se complementam, sendo elas: hemostase, inflamatória, proliferativa e de remodelação. (HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2014). Alguns autores como Qiao e colaboradores (2011) e Wilgus (2008) consideram que a fase de hemostase e a fase inflamatória ocorrem juntas. As células do sistema imunológico podem ter grande impacto no processo de reparo em cada uma dessas fases (FIGURA 3). (WILGUS, 2008).

FIGURA 3 – FASES DA CICATRIZAÇÃO DE MURINOS



FONTE: O autor (2016), baseado em Witte e Barbul (1997)

2.2.1 Fase de Hemostase

A fase de hemostase se inicia logo após a pele ser lesionada. Quando isso ocorre, os vasos sanguíneos danificados extravasam sangue, e juntamente com a lesão ocorre um aumento na concentração de cálcio citoplasmático, que é responsável por modular a contração do músculo liso na camada circular dos vasos danificados, a fim de tentar diminuir o sangramento. Além disso, ocorre a formação de um coágulo. (HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2014). Um dos mecanismos que influenciam a formação do coágulo é a produção de fatores de crescimento e citocinas que são responsáveis por regular as vias intrínseca e extrínseca da cascata de coagulação. Este mecanismo se inicia quando as plaquetas, que são essenciais para a formação do tampão hemostático inicial, liberam mediadores da cascata de coagulação intrínseca, ativando o fator Hageman XII, que inicia a cascata de clivagem proteolítica ativando assim o fator X. Na sequência, no interior do tecido, a pró-trombina é ativada para formar trombina, que cliva o fibrinogênio gerando fibrina que é fundamental para a formação do coágulo. O coágulo é composto por fibrina e glicoproteínas adesivas que são importantes constituintes da MEC tais como fibronectina, vitronectina e trombospondina, também são de suma importância para essa fase da cicatrização, pois são responsáveis não só pela contenção da perda de sangue, através da formação do coágulo, mas também pela primeira defesa do órgão, contra invasores microbianos. (MENDONÇA; NETTO, 2009; REINKE; SORG, 2012, HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2014).

Além disso, a trombina liberada pelas plaquetas no local da ferida também induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias como, CCL2, interleucina-6 (IL-6), e interleucina- 8 (IL-8), por células

endoteliais, que são responsáveis por induzirem a quimiotaxia de monócitos. (HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2014; THIRUVOTH et al., 2015).

As plaquetas também liberam, fatores de ativação de fibroblastos locais e de células endoteliais, vasoconstritores, fatores de crescimento como o derivado de plaquetas (PGDF), o transformante- β (TGF- β), o epidérmico (EGF), o transformante- α (TGF- α), o de células endoteliais (VEGF) e glicoproteínas adesivas, como a fibronectina e trombospondina, que são importantes constituintes da MEC provisória. (SANTORO; GAUDINO, 2005; MENDONÇA; NETTO, 2009 THIRUVOTH et al., 2015)

Para que as células inflamatórias consigam chegar ao local da ferida, ocorre a liberação de histamina pela degranulação de mastócitos, o que provoca vasodilatação local tornando os vasos porosos e facilitando a passagem dessas células, assim dando início a fase inflamatória. (DELAVERY et al., 2011; HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2014).

2.2.2 Fase Inflamatória

A fase inflamatória é iniciada logo após a fase de hemostase e perdura até que ocorra a completa cicatrização do tecido. (NISHIO et al., 2009). O objetivo principal desta fase é a proteção contra agentes microbianos, contribuição para a eliminação de detritos e iniciação do processo de reparação. (WERNER; KRIEG; SMOLA, 2007; EMING et al., 2009; LUCAS et al., 2010). Nesse processo, várias células têm papel fundamental.

Uma das primeiras células de defesa a participarem do processo são os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos). Essas células são células altamente móveis e chegam à ferida minutos após a lesão ter ocorrido. Os neutrófilos são mediados por mecanismos de sinalização química, como pela cascata do complemento, ativação de interleucina, tais como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, citocina (TNF- α) e fator de crescimento transformante beta (TGF- β). (GONZALEZ et al., 2016). A função dos neutrófilos na cicatrização é remover partículas estranhas, como restos de tecidos lesionados e bactérias localizadas na lesão. Para isso possuem três principais mecanismos de destruição:

1. através da fagocitose - em que as células internalizam e digerem partículas estranhas encontradas no meio;
2. através da liberação e degranulação de substâncias tóxicas como: lactoferrina, proteases e a catepsina, que são capazes de matar bactérias;

3. morte de bactérias do meio extracelular, através da produção de redes de cromatina e protease. (HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2014; WERNER; GROSE, 2003).

Após cumprirem suas funções, os neutrófilos sofrem um tipo de morte celular denominada netose, porém antes disso ao produzirem citocinas pró-inflamatórias estimulam os monócitos do sangue a virem para o local da lesão e diferenciarem-se em macrófagos teciduais. Esses por sua vez fagocitam os neutrófilos restantes no local. (DELAVERY et al., 2011; HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2014).

Os macrófagos são células fagocíticas muito maiores que os neutrófilos, que são geralmente encontrados no local da ferida de 48 à 72h após a lesão ter ocorrido. Eles são atraídos para a ferida pelos neutrófilos e por mensageiros químicos liberados pelas plaquetas e células danificadas. Também são responsáveis por fagocitar bactérias e restos celulares da ferida, evitando assim infecções no local da lesão. (DELAVERY et al., 2011; REINKE; SORG, 2012; HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2014).

Alguns macrófagos que permanecem na área da lesão, além de exercer a função de limpeza do local, também estimulam a produção de colágeno, angiogênese e a reepitelização do tecido, influenciando no processo de cicatrização. (BAUM; ARPEY, 2005). Além disso, com a angiogênese ocorre a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, atraindo-os para a lesão. Isso ocorre na sobreposição da fase inflamatória com a fase proliferativa. (CHAPONNIER; DESMOULIÈRE; GABBIANI, 2005; DELAVERY et al., 2011; DARBY et al., 2014).

As células T estão presentes na epiderme e na derme da pele de humanos e são de extrema importância para a resposta imunológica, homeostase da pele e reparação da ferida. (TOULON et al., 2009). Elas têm uma influência diretamente na cicatrização de feridas, pois quando ocorre uma depleção global de células T, *in vivo*, ocorre uma diminuição na resistência da ferida, ou seja, a lesão fica mais sensível. (BARBUL et al., 1989).

Os linfócitos também participam da fase inflamatória, chegando ao local da ferida 72 horas após a lesão ter ocorrido e são responsáveis pela regulação da cicatrização da lesão, pois conferem resistência a ferida, modulando a atividade dos fibroblastos durante a cicatrização, exercendo a remodelação do colágeno, através das linfocinas, que são proteínas liberadas pelos linfócitos. (PETERSON et al., 1987; HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2014).

A fase inflamatória deve ser bem equilibrada e modulada, por essas células, pois é de suma importância para que o processo de cicatrização ocorra com sucesso. Como há esses períodos de sobreposição de fases é difícil saber a qual fase cada resposta corresponde, porém é possível afirmar que esse processo é contínuo sendo necessário que ocorra um processo para estimular a execução do próximo passo.

A MEC provisória e a proliferação de queratinócitos se iniciam nesse período de sobreposição de fases, ou seja, sobreposição entre a fase inflamatória e fase proliferativa.

A formação da matriz provisória facilita a adesão, a migração e a proliferação das células no local da ferida. (CHAPONNIER; DESMOULIÈRE; GABBIANI, 2005; DELAVARY et al., 2011; DARBY et al., 2014). Após a MEC provisória ser formada inicia-se a produção do tecido de granulação, sendo necessário que aconteça a invasão de células endoteliais resultando assim na formação de novos vasos sanguíneos.

2.2.3 Fase Proliferativa

A fase de proliferação tem como principais funções a formação de novos vasos no local da lesão, a formação do tecido de granulação, a deposição de colágeno e a regeneração da epiderme no local lesionado. (DELAVARY et al., 2011; LANDÉN; LI; STÅHLE, 2016). As duas primeiras funções se iniciam na sobreposição dessa fase com a fase inflamatória.

Nesse estágio da fase de proliferação, a lesão começa a ganhar volume devido à continuação da formação de tecido de granulação, já iniciada na fase inflamatória. O tecido de granulação é um tecido fibroso, composto por diferentes tipos de colágenos, e é caracterizado por apresentar uma coloração mais rosada. Esse tecido tem como função substituir o coágulo no local da ferida. (HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2014).

Os fibroblastos e miofibroblastos, que são fibroblastos especializados, são de suma importância para a cicatrização, pois são responsáveis por produzir a MEC necessária para suportar as novas células e vasos sanguíneos, os quais fornecem nutrientes e oxigênio para que ocorra o crescimento e a proliferação celular.

Alguns fibroblastos já estão presentes no local da ferida, seja na região do tecido envolvido na lesão ou podem ser derivados de células mesenquimais das proximidades da ferida. Além disso, as citocinas estimulam os fibroblastos e os miofibroblastos a produzir: moléculas da MEC, dentre elas o colágeno, e diversos fatores de crescimento, como PDGF, Fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2) e *insulin like growth factor 1* (IGF-1). (KALLURI; NEILSON, 2003; WERNER; GROSE, 2003; DELAVARY et al., 2011; DARBY et al., 2014).

Os miofibroblastos são caracterizados por expressar α -SMA, uma isoforma de actina presente em células contráteis. Dessa forma, juntamente com a ajuda dos queratinócitos, a lesão começa a se fechar, pois as fibras contráteis dos miofibroblastos exercem uma força mecânica e os queratinócitos presentes nas margens da lesão se proliferam em direção ao centro da ferida, fazendo com que se

inicie a reepitelialização. (AMADEU et al., 2008). Além disso, os miofibroblastos produzem maiores quantidades de componentes da MEC que os fibroblastos. (MARTINEZ-FERRER et al., 2010; HINZ et al., 2001).

Várias são as moléculas que estão relacionadas com essa fase. Existem receptores transmembranares que, quando estimulados, desencadeiam a expressão de proteínas intracelulares reguladoras que são conhecidas como Smads. O mediador de sinalização citoplasmática para TGF- β é o Smad3. Segundo Ashcroft e colaboradores (1999) a diminuição da sinalização de Smad3 melhora consideravelmente a cicatrização e promove a inibição de fibrose. Esse resultado sugere um papel importante para o TGF- β e Smad3 na cicatrização de feridas e na formação da cicatriz. (ASHCROFT et al., 1999). Os macrófagos são uma fonte importante de TGF- β . Esta proteína promove à reparação de feridas, a angiogênese, à produção de colágeno e também a redução da degradação da MEC por collagenases, que se dá através da ativação das metaloproteinases (MMPs). Dentre as citocinas envolvidas no processo de cicatrização da pele, o TGF- β 1 é uma das mais importantes, pois ele é responsável pela síntese da MEC, regulação da proliferação celular e pela expressão da actina de músculo liso α (α -SMA). (LI et al., 2016).

Além disso, o TGF- β , estimula a quimiotaxia e a produção de citocinas que são importantes para influenciar fibroblastos a proliferar e migrar para a ferida. Estimula também células mesenquimais e a liberação de fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que é proveniente do coágulo hemostático e pode mediar a transição das células mesenquimais para miofibroblastos. (RUNDHAUG, 2005, BAUM; ARPEY, 2005, HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2014).

Estudos realizados por Li e colaboradores (2016), indicam que a integrina ligada a quinase (ILK) é um mediador importante para “*crosstalk*”, pois a ILK está ligada com a via de TGF- β 1, e através da ILK desencadeia a superexpressão da α - SMA. O TGF- β 1 promove a expressão de fibronectina e MMP-2, em que a expressão desta é bloqueada por inibidores de ILK. Além disso, a ILK pode estar envolvida na regeneração de vários tecidos lesionados, pois aumenta a expressão da (α - SMA) e colágeno tipo I. (LI et al., 2016; SERRANO et al., 2013). As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco, que degradam vários componentes da MEC, como colágeno, elastina e proteoglicanos. A atividade das MMPs influencia as funções básicas do comportamento celular, tais como a proliferação, diferenciação, migração e a apoptose. (ENOCH, LEAPER, 2005; SANTOS et al., 2011). Sendo que, por exemplo, a migração que é um processo complexo necessita que ocorram eventos coordenados, inter e intracelulares, fazendo com que ocorra a remodelação da matriz e reorganização do citoesqueleto. (YUE et al., 2010).

Além disso, as MMPs influenciam no processo de formação de novos vasos, que ocorre a partir de vasos sanguíneos pré-existentes, e é necessário que aconteça a degradação da membrana basal e

a remodelação da MEC, para que as células endoteliais possam migrar e invadir o tecido circundante. Em resumo as MMPs promovem angiogênese por meio da liberação de fatores de crescimento angiogênicos presos à MEC, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que combinado com citocinas, induzem as células endoteliais a ativar a neovascularização, a reparação de vasos sanguíneos danificados e a remodelação da MEC. (RUNDHAUG, 2005).

A família do VEGF é composta por VEGF-A, B, C, D e pelo fator de crescimento da placenta. O VEGF-A é o fator que media a pró- angiogênese, porém também contribui para o edema, pois interfere no aumento da permeabilidade vascular. Além disso, outros fatores, como o PDGF e o TGF- β também promovem a angiogênese. (DIPIETRO, 2016).

Poucas MMPs são expressas constitutivamente, então elas são reguladas por pelo menos três maneiras diferentes:

1. Através da regulação da expressão gênica;
2. As MMPs são secretadas por células como pró-enzimas (zimogênios), podendo ser ativadas e controladas por clivagem extracelular;
3. As MMPs ativas podem ser reguladas através de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). (BAUM; ARPEY, 2005).

Após isso, a epitelização é iniciada no local da lesão quando células epiteliais se proliferam e migram a partir das margens da ferida a fim de formar uma camada sobre a lesão, ligando-se à MEC existente abaixo. Uma vez reconstruída a epiderme, a ferida fica protegida contra agentes externos, ocorrendo um isolamento do meio externo e iniciando-se a última fase, chamada de fase de remodelação. (AMADEU et al., 2008).

2.2.4 Fase de Remodelação

A fase de remodelação tem o intuito de recuperar a estrutura normal da pele. Essa é a fase mais longa de todo o processo de cicatrização, podendo durar de meses a anos. Durante essa fase a proliferação de células, assim como a demanda de nutrientes e a síntese de proteínas diminuem. Além disso, ocorre a regressão de capilares recém-formados e a maioria das células endoteliais e miofibroblastos sofrem apoptose ou saem da ferida. (GURTNER et al., 2008). Pode se dizer que essa fase é um equilíbrio entre a produção de MEC e a remodelação do colágeno. Segundo Tredget e colaboradores (2006) esse equilíbrio é determinado pelo microambiente da cicatriz que provavelmente é mantido pelas células T, macrófagos e outras células imunes que infiltram no local da ferida.

As células T tornam a cicatrização mais complexa e uma das principais funções dessas células é a regulação negativa do crescimento de tecido fibroso. Isso sugere que mais células do tipo Th1 preenchem a ferida nessa fase da cicatrização. As células do tipo Th1 podem ser ativadas diretamente por uma célula apresentadora de antígeno, sendo que, após ser ativada ela produz citocinas que ativam linfócitos B e linfócitos T CD8. As Th1 produzem principalmente interferon -gama (IFN- γ) que resultam na diferenciação de macrófagos do tipo M1. (DELAVARY et al., 2011; TREDGET et al., 2006). Os macrófagos do tipo M1, também chamados de classicamente ativados, produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-12 e TNF. Esse tipo de macrófago desempenha uma função importante na modulação de outros tipos celulares que secretam proteases neutras que degradam moléculas da MEC. (DELAVARY et al., 2011).

Um dos componentes mais importantes da MEC no processo de cicatrização é o colágeno, sendo que o rearranjo dessas fibras é um dos processos mais importantes na fase de remodelação. As IFN- γ e TNF- α são moléculas capazes de diminuir a síntese de colagenase. Além disso, as MMPs, cuja família tem a capacidade de degradar praticamente todos os componentes da MEC, e seus inibidores naturais, as TIMPs são mediadores importantes da atividade proteolítica durante o processo de remodelação do tecido. (DELAVARY et al., 2011; GANTWERKER; HOM, 2011; SANTOS et al., 2011).

Os macrófagos são ricos em MMPs, sendo que as que estão envolvidas no processo de cicatrização são principalmente a MMP-2, MMP-9, MMP-12 e MMP-19. A MMP-12, por exemplo, é uma metaloproteinase específica de macrófagos, que supõe-se que desempenha um papel na regressão dos capilares em feridas da pele, o que resulta em uma diminuição do eritema. (MADLENER; PARKS; WERNER, 1998). As MMP-2 e a MMP-9 são produzidas por diversas células como, células epiteliais, células estromais e macrófagos. (SANTOS et al., 2011). Em resumo a fase de remodelação é principalmente caracterizada pela substituição do tecido de granulação por uma cicatriz, onde ocorre a ativação de MMPs, responsáveis por degradar componentes da MEC provisória. O colágeno tipo III é substituído pelo colágeno tipo I, que oferece maior resistência. (AMADEU et al., 2008, REINKE; SORG, 2012). Posteriormente os miofibroblastos se aderem aos colágenos e causam contrações que ajudam a diminuir a superfície da cicatriz. (REINKE; SORG, 2012).

Por mais que esta fase da cicatrização tente fazer com que o tecido se regenere normalmente, existem componentes da pele que não conseguem se recuperar após a lesão, como folículos pilosos, apêndices ou glândulas sudoríparas, pois não possuem a capacidade de crescer na região. (REINKE; SORG, 2012).

Para que o processo de cicatrização ocorra é necessário que as quatro fases estejam coordenadas espaço e temporalmente. (AMADEU et al., 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas e no Laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados, situados no Departamento de Biologia Celular, no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

3.1 COMPLEXO M1

O M1, foi manipulado e gentilmente cedido pela Farmácia de Manipulação Homeoterápica (<http://www.homeoterapica.com.br/>). O M1 é composto por substâncias de origem vegetal, mineral e animal, cujos componentes estão descritos na tabela 1. Em geral, a preparação de soluções altamente diluídas parte de tinturas-mãe (TM), que são submetidas a diluições. As diluições decimais (recebem a sigla dH, onde o “d” significa decimal e o “H” significa Hahnemanniana) seriadas são realizadas em água destilada, ou seja, é utilizada uma parte da tintura-mãe em 9 partes de água destilada. Após essa diluição utiliza-se uma parte dessa última diluição em 9 partes de água destilada e assim sucessivamente até que a solução obtenha a potência necessária. As diluições também podem ser em ordem centesimal (recebem a sigla cH). Entre cada diluição é necessário realizar a sucussão, ou seja, a solução deve ser agitada/dinamizada fortemente por 100 vezes. (OLIVEIRA et al. 2011).

Para o tratamento *in vivo*, o M1 foi utilizado em formulação de gel composto por base cosmética aniônica de carbopol (VIA FARMA, Fab. CASA SIENA, Lote: 28383) ao qual foi adicionado 10% (v/m) de M1 já na sua diluição final após sucussão. As tinturas-mãe foram adquiridas de agências autorizadas e licenciadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de modo a assegurar a qualidade e a composição físico-química dos produtos.

Para o tratamento *in vitro*, os medicamentos foram utilizados na formulação aquosa, e tanto M1 quanto o veículo (água) foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22µm, e sempre mantidos à temperatura ambiente, protegidos da luz.

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DO COMPLEXO NATURAL ALTAMENTE DILUÍDO M1.

ORIGEM DOS COMPONENTES	COMPONENTES	MATRIZ	POTÊNCIA
Vegetal	<i>Aconitum napellus</i>	TM	20 dH
Mineral	<i>Arsenicum álbum</i>	6 dH	18 dH
Vegetal	<i>Asa foetida</i>	TM	20 dH
Animal	<i>Calcareo carbônica</i>	8 dH	16 dH
Vegetal	<i>Chelidonium majus</i>	TM	20 dH
Vegetal	<i>Cinnamon</i>	TM	20 dH
Vegetal	<i>Conium maculatum</i>	5 dH	17 dH
Vegetal	<i>Echinacea purpúrea</i>	TM	20 dH
Vegetal	<i>Gelsemium sempervirens</i>	TM	20 dH
Vegetal	<i>Ipecacuanha</i>	5 dH	13 dH
Mineral	<i>Phosphorus</i>	12 dH	20 dH
Vegetal	<i>Rhus toxicodendron</i>	6 dH	17 dH
Mineral	<i>Silicea</i>	12 dH	20 dH
Mineral	<i>Sulphur</i>	12 dH	24 dH
Vegetal	<i>Thuja occidentalis</i>	6 dH	19 dH

TM= tintura-mãe, dH= decimal Hahnemanniana.

FONTE: Adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2011), GONÇALVES (2013).

3.2 AMOSTRAS DE PELE DE CAMUNDONGOS

As amostras de pele utilizadas neste trabalho foram obtidas por Gonçalves (2013) cujo protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO-UFPR), e recebeu o número de aprovação 694 (ANEXO 9). Os detalhes da experimentação estão descritos na monografia de conclusão de curso de Gonçalves (2013). Em resumo, foram induzidas duas feridas circulares de 6 mm de diâmetro no dorso de camundongos albinos suíços machos, com idade aproximada de 2 meses. As feridas foram tratadas logo após a cirurgia, e a cada 24h com aproximadamente 180 mg/cm² do CNAD M1 na forma de gel.

Os animais foram mantidos no biotério da UFPR em gaiolas individuais durante o período experimental com água e ração *ad libitum* e ciclo claro escuro de 12h. Após os períodos experimentais de 3 ou 10 dias, os animais foram anestesiados, mortos por deslocamento da cervical e amostras, de aproximadamente 3 mm de pele ao redor de cada lesão foram coletadas e congeladas a -80°C.

No presente trabalho utilizamos essas amostras preservadas em 2013 para detectar a expressão das moléculas relacionadas com a cicatrização. Para verificar a presença de proteínas foi

utilizada a técnica de *western blotting*. As amostras de pele utilizadas no trabalho foram obtidas de 4 animais controle e 4 tratados com M1, após 3 ou 10 dias de tratamento.

3.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para padronizar a extração de proteínas do tecido congelado a -80°C , todos os fragmentos da pele foram cortados, e pesados, sendo que foram utilizados aproximadamente 0,0200g de pele de cada animal. O tecido correspondente de cada animal foi homogeneizado em 1,5mL de tampão de extração de proteínas RIPA (ANEXO 1) contendo inibidor de protease (Sigma-Aldrich®) em tubos de centrifuga de 15mL. Esse processo foi realizado em gelo, utilizando homogeneizador de tecidos (Tissue Ruptor - Fow low – Qiagen® – 2006), até que todo o tecido estivesse, visualmente, dissociado. Após a homogeneização de todas as amostras, esses foram transferidos para microtubos de centrifuga e submetidos à fervura por 5 minutos. Posteriormente foram centrifugadas por uma hora, a uma velocidade de 20.000g (rcf) a temperatura de 4°C . Após a centrifugação, o sobrenadante das amostras foi coletado e mantido a -20°C . O *pellet* foi descartado.

Após a extração das proteínas é importante saber em qual concentração os extratos serão utilizados para que as amostras sejam comparadas em uma base equivalente. Para tal, a concentração de proteína de cada amostra foi quantificada através de método colorimétrico utilizando o kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific® - Cod.23225), sendo que 25µL das amostras e dos padrões com concentrações conhecidas de BSA, que variam de (0 a 2000 µg/mL de BSA), foram incubados com 200 µL de *working reagent* em uma placa de 96 poços por 30 minutos em banho-maria a 37°C (apenas no vapor). Após esse tempo, as absorbâncias foram lidas no espectrofotômetro de microplacas Epoch (BioTek® Instruments, Inc), utilizando o comprimento de onda 562nm. A absorbância das amostras foi comparada com a curva padrão de BSA para determinação da concentração proteica.

3.4 WESTERN BLOTTING E IMUNOBLOTTING

Western blotting é uma técnica utilizada para separação e identificação de proteínas. A separação das proteínas, com base no peso molecular, ocorre através de corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. (MAHMOOD; YANG, 2012). Utilizamos dois tipos de gel, o de empilhamento, cuja

malha é mais frouxa, contendo 5 % de acrilamida, e o gel de separação, cuja malha é mais apertada, apresenta 10% de acrilamida. O protocolo detalhado encontra-se em anexo (ANEXO 2-8).

Na preparação das amostras foram utilizados lisados celulares da pele de camundongos que foram tratados com complexo natural altamente diluído M1. As amostras foram diluídas em tampão de amostra redutor (Tris HCl 0,3 M pH 6,8, 50% v/v de glicerol, 10% m/v de SDS e 5% v/v de 2-mercaptoetanol), sendo que o mercaptoetanol presente no tampão faz com que as pontes dissulfeto, que ligam as diferentes cadeias polipeptídicas das proteínas, fossem quebradas. Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 minutos para que as proteínas desnaturassem, e 10µg de proteína (contidas em 30 µL de solução) de cada amostra foram aplicadas em cada poço do gel de poliacrilamida. Para comparação de peso molecular, foi utilizado NOVEX Sharp Pre-Stained Protein Standards (Invitrogen® – P/N 57318), em que foi adicionado 5µL de padrão de peso molecular misturado com 35 µL de tampão de amostra não redutor em ambas extremidades do gel .

As amostras foram submetidas a corrente de 50 mA por aproximadamente 3 horas, em tampão de corrida, ocorrendo assim a separação eletroforética das proteínas. Posteriormente, as proteínas presentes no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Biosciences® - Hybond™- C Extra. Cat: RPN303E), por três horas, com tensão de 100 V.

Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com TBST/ 5% BSA, por 1 hora, para evitar ligações inespecíficas de anticorpos. Logo após, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários específicos contra as proteínas de interesse. Os anticorpos primários utilizados foram contra MMP-2 (Santa Cruz®, sc 10736), MMP-9 (Santa Cruz®, sc-6841), α- SMA (Sigma- Aldrich® A5228) ou VEGF (Santa Cruz®,sc-1876), nas concentração de 2µg/mL. Como normalizadores, foram utilizados a actina (Santa Cruz®, sc-1616) ou α-Tubulina (Invitrogen®, MA1-25062) na concentração de 1µg/mL.

Posteriormente os anticorpos secundários conjugados à peroxidase, correspondentes aos anticorpos primários, anti-goat (Invitrogen®, 611620), anti- rabbit (Santa Cruz®, sc- 2004) ou anti-mouse (BD®, 554002), foram incubados por 1 hora, nas membranas que continham a molécula de interesse, previamente incubada com o anticorpo primário. As bandas relativas às proteínas estudadas foram visualizadas através do método de detecção que utiliza substrato quimioluminescente da peroxidase (ECL - *Enhanced chemiluminescent hrp substrate*), que quando combinado com a enzima, produz luz como um subproduto, tornando-a visível. Para isso, foi utilizado o kit *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific®, 34087), em que os reagentes foram misturados na proporção de 1:1 (*Luminol/ Enhancer solution* e *Stable peroxide solution*), na hora de usar. As membranas foram reveladas no aparelho Amersham™ Imager 600 da General Electric® (GE). Após a marcação, as membranas foram desmarcadas, primeiramente através de água milli-Q por 5 minutos no

agitador, após isso foi realizada uma lavagem com NaOH 0,2M por 10 minutos e por último outra lavagem com água milli-Q, por 5 minutos. Ao final disso as membranas foram congeladas a - 20°C.

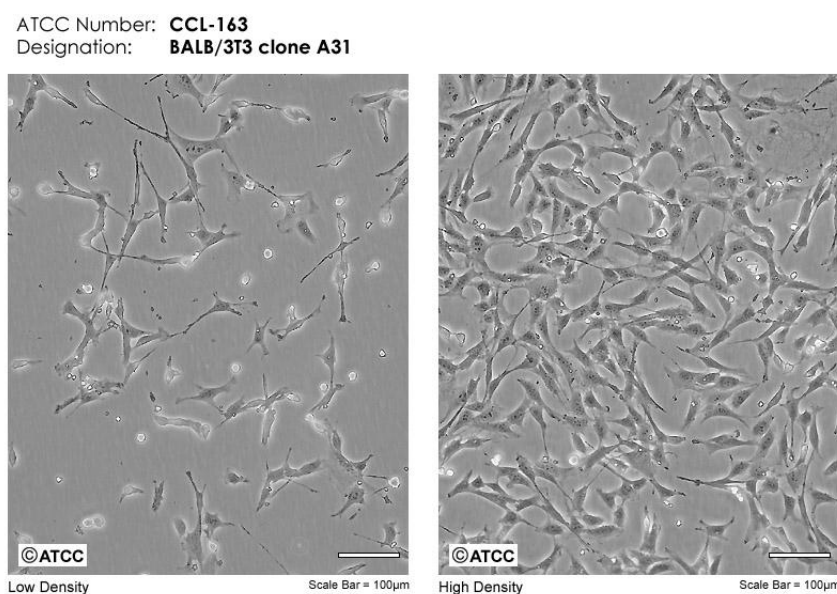
A quantificação de proteínas por *western blotting* fornece uma comparação da quantidade da proteína de interesse com uma ou mais proteínas cuja expressão é considerada estável pela maioria das células, nesse caso a proteína normalizadora foi a actina (MAHMOOD; YANG, 2012), com exceção da marcação de α -SMA que foi normalizada pela quantidade total de proteínas de cada amostra através da coloração com Ponceau S, por apresentar problemas para desmarcar a proteína de interesse.

3.5 CULTIVO CELULAR

Com o intuito de avaliar os efeitos do M1 diretamente sobre células presentes na pele, foram analisadas *in vitro*, células de fibroblastos murinos da linhagem BALB/3T3 (ATCC, CCL-163) (FIGURA 4), gentilmente cedidas pelo Instituto Carlos Chagas do Paraná (ICC-PR).

As células foram cultivadas em garrafas com área de crescimento de 25cm² (SARSTEDT®-N00810), em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 10% de SFB - Soro Fetal Bovino (Gibco®- Cat.12657029), contendo os antibióticos 100U/mL penicilina e 100µg/mL streptomycin (Life technologies™) (meio completo) e mantidas em incubadora com 5% de CO₂ (Thermo Scientific® – series 8000WJ) a 37° C, em atmosfera úmida. As células foram subcultivadas por no máximo 5 passagens após o descongelamento

FIGURA 4 – FIBROBLASTOS MURINOS DA LINHAGEM BALB/3T3



FONTE: ATCC.

Após atingirem no máximo 80% de confluência, (aproximadamente 3 dias), o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS estéril, desaderidas por meio da exposição com tripsina-EDTA 0,05% (Gibco® - Cat. 15400054) em PBS estéril por 3 minutos, inativação com meio completo, coletadas em tubos falcon de 15 ml (SARSTEDT®- 62.554.205), centrifugadas a 2000rpm (rotações por minuto) por 3 minutos, ressuspensas em meio completo, contadas em Câmara de Neubauer e plaqueadas conforme a necessidade do protocolo experimental realizado.

Para todos os ensaios *in vitro*, as células de fibroblastos foram plaqueadas na concentração de 2000 células/poço, em placas de 96 poços. Após 6 horas, foram tratadas com 20% v/v com o veículo (H₂O) ou com M1, sendo que a cada 24 horas foram administradas doses reforço de 1% v/v, até o tempo máximo de 96 horas. Ambos veículo ou M1 foram sucussionados contra a palma da mão, 20 vezes imediatamente antes de cada tratamento.

3.6 FUNCIONALIDADE CELULAR

Foram realizados métodos de detecção da funcionalidade celular *in vitro* a fim de verificar se o tratamento com M1 alterava processos normais das células, ou seja, se o medicamento não era capaz de alterar alguma organela celular.

Foram realizados ensaios de detecção de atividade redutora mitocondrial utilizando o reagente MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio), assim como ensaio de capacidade de retenção de vermelho neutro em vesículas ácidas.

3.6.1 MTT

Esse método tem como finalidade verificar a atividade mitocondrial. O MTT é uma substância que apresenta coloração amarela e que ao penetrar na célula, se a mitocôndria estiver com seu funcionamento normal, sofrerá reação de oxirredução por essa. Ao ser reduzido ocorre a formação de cristais de formazan que apresentam coloração púrpura. Esses cristais de formazan foram então solubilizados e quantificados por espectrofotometria. O resultado obtido pela coloração é proporcional à quantidade de células contendo mitocôndrias metabolicamente ativas. (MOSSMAN, 1983; WANG et al., 2012).

Para esse ensaio, finalizados os tempos de tratamento, foram adicionados aos poços 20 µL de solução mãe de MTT (SIGMA® – 135038) 5 mg/mL, com concentração final nos poços de 0,45 mg/mL.

Após 3 horas de incubação (à 37°C e 5% CO₂) foi retirado todo o volume dos poços e adicionados 100 µL/poço de solução de dimetilsulfóxido (DMSO) para a eluição dos cristais formados. A solução foi homogeneizada por 15 minutos no *shaker* e lida em espectrofotômetro de microplacas Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc) em 550 nm.

3.6.2 Vermelho neutro

O vermelho neutro é um corante lipofílico, que uma vez internalizado e protonado, se torna incapaz de atravessar membranas ficando preso nas células viáveis e se acumulando em vesículas ácidas (como lisossomos por exemplo). Uma vez eluído, pode ser realizada a quantificação através da absorbância do conteúdo de corante retido. (BORENFREUND; PUERNER, 1985; REPETT; DEL PESO; ZURITA, 2008).

Após o tempo de tratamento o ensaio foi realizado, adicionando-se 20µL da solução de vermelho neutro (SIGMA®- N2889) 1100 µg/mL (concentração final de vermelho neutro nos poços = 100 µg/mL), seguido de incubação por 2 horas à 37°C e 5% CO₂. Em seguida, foi retirado todo o volume de solução da placa, os poços foram lavados com PBS a 37°C e, posteriormente, foram adicionados 100 µL de solução de eluição (etanol 50%/ ácido acético 1%) em cada poço. A solução foi homogeneizada no agitador por 15 minutos e então a absorbância foi lida em leitor de microplacas Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc.) em 550 nm.

Para os ensaios de funcionalidade celular (MTT e Vermelho neutro), foi realizada normalização dos dados através do ensaio de proliferação utilizando cristal violeta, descrito na sequência, o qual estima a quantidade de células presentes em cada poço experimental. Para tal, foi calculada a média de absorbância do controle (H₂O) e do tratado com M1. Posteriormente, a média das absorbâncias foi dividida pela média do número de células presentes naquele tempo, cujo este é o valor da média da absorbância obtido no ensaio do cristal violeta.

3.7 PROLIFERAÇÃO CELULAR

O ensaio de coloração com cristal violeta (CV) após tratamento com M1 foi realizado por Gonçalves (2016), com o intuito de avaliar a proliferação celular, pois, esse corante se liga no DNA das células e assim, através da absorbância, é possível saber a densidade de células por poço quando compara-se a uma curva padrão de densidades conhecidas. Sendo assim, quanto maior for a

absorbância, proporcionalmente mais células estão aderidas no poço. (GILLIES; DIDIER; DENTON, 1986).

Após o final dos tratamentos *in vitro*, as células foram lavadas com PBS a 37°C, fixadas com Cytofix (BD) por 30 minutos em gelo. Após, foram incubadas por 10 minutos em solução de água contendo 0,25mg/mL de cristal violeta, previamente filtrada antes do uso. Após o tempo de incubação eram lavadas com água destilada e eluídas em solução de ácido acético 33% através de incubação em agitador de placas, à temperatura ambiente por 30 minutos. A absorbância das amostras foi medida em leitor de microplacas Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc.) utilizando o comprimento de onda de 570nm. Para determinar o número de células correspondente à absorbância, foi utilizada comparação com curva padrão de número de células (de zero a cinquenta mil células). A curva padrão foi plaqueada 6 horas antes do início do ensaio a fim de garantir precisão nos resultados obtidos.

3.8 CICATRIZAÇÃO *IN VITRO*

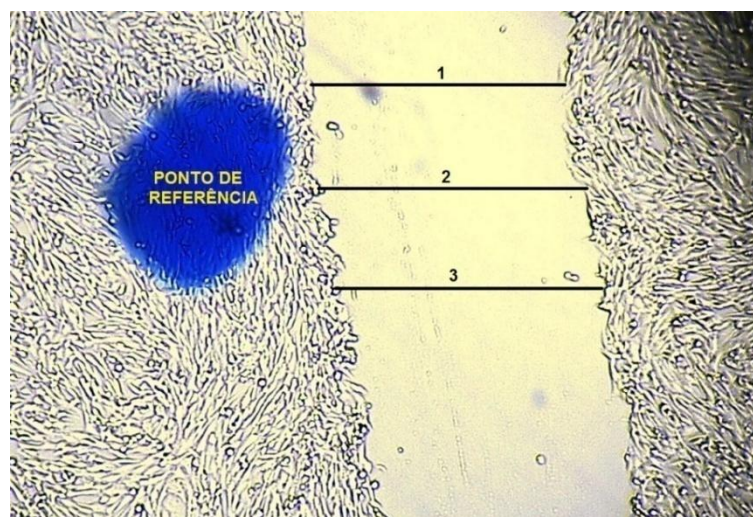
O ensaio de cicatrização, foi realizado através do método de "scratch" (LIANG; PARK; GUAN, 2007), que é utilizado para mimetizar o fechamento de uma ferida, a fim de verificar se a aceleração do fechamento da ferida após o tratamento com M1 ocorreu via modificação na capacidade migratória dos fibroblastos, da linhagem BALB/3T3.

Antes de as células serem plaqueadas, foi feito um ponto no centro de cada poço, com uma caneta permanente, com o intuito de ter um ponto de referência para tirar as fotografias. Para esse ensaio foram plaqueados fibroblastos suficientes para atingir 100% de confluência em placas de 96 poços, em que foram plaqueadas 40×10^3 células por poço. Após a adesão das células foi feito um risco em cada poço com o auxílio de uma ponteira de plástico de 10µL. As células soltas foram removidas por lavagem com PBS, e posteriormente foi adicionado meio DMEM completo. Na sequência as células foram tratadas como descrito para os outros ensaios *in vitro* até que fosse observado o fechamento do risco. Foram realizados registros fotográficos de todos os poços. Para isso foram capturadas imagens em um microscópio invertido (Leica) utilizando objetiva de 100x, no tempo 0, ou seja, logo após os riscos serem feitos, e posteriormente 18, 23, 27, 40, 46 e 70h. As imagens foram capturadas através do software Leica Application Suite (Las ez, versão 3.0.0).

As imagens obtidas foram analisadas com o auxílio do software ImageJ Fiji (SCHINDELIN et al., 2013), como esquematizado na FIGURA 5. Foi medida a distância entre as margens do risco e, posteriormente, calculada a média das replicatas técnicas para cada experimento independente. A

partir da média foi calculada a porcentagem de fechamento para cada tempo comparando-se com o tempo 0. Onde, o tempo 0 representava 100% aberto e quando não era possível traçar uma linha entre as duas margens era considerado 0% aberto.

FIGURA 5: ESQUEMA DA ANÁLISE DAS IMAGENS DO ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO *IN VITRO*



Através do software ImageJ Fiji (SCHINDELIN et al., 2013), foram traçadas 3 linhas (1, 2 e 3), a fim de medir a distância entre as margens, usando o ponto azul como referência. Foi calculada a média entre os 3 valores obtidos, de cada tempo em cada experimento independente.

FONTE: O autor (2016)

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizados 3 experimentos independentes para os ensaios de proliferação e funcionalidade celular *in vitro* e 5 experimentos independentes para o ensaio de cicatrização *in vitro*. No caso dos experimentos utilizando amostras de material preservados dos tratamentos *in vivo*, foi considerado $n=4$, uma vez que havia disponibilidade de amostras resultantes de 4 animais de cada grupo. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism.

Devido ao pequeno número de amostras em todos os ensaios realizados, a distribuição dos dados foi considerada não paramétrica. (WEISSGERBER et al., 2015). Dessa forma, os grupos controle e tratado foram comparados usando o teste Mann-Whitney. Os dados são visualizados em gráficos de dispersão mostrando a mediana entre os dados. Foram considerados significativos os valores comparados ao nível de significância de $p<0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma vez que se verificou que o complexo M1 era capaz de alterar a velocidade de fechamento da ferida *in vivo*, tornando a cicatrização mais eficaz (GONÇALVES, 2013), foram avaliadas a expressão de moléculas que estão envolvidas no processo da cicatrização, a fim de explicar se estas seriam alvos do medicamento no processo de melhora da cicatrização observada *in vivo*. Além disso, foi utilizado experimento de cicatrização *in vitro* na tentativa de verificar se a alteração da velocidade de fechamento da ferida poderia estar relacionada com a modificação da capacidade migratória das células envolvidas no processo (fibroblastos).

4.1 EXPRESSÃO DE ALFA-SMA

A α -SMA é uma isoforma da actina, que é expressa por miofibroblastos, quando ativados, tem papel muito importante na síntese de MEC. Os miofibroblastos são capazes de aumentar a velocidade de fechamento da ferida, através de uma maior contração na borda das feridas. (CHERNG; YOUNG; MA, 2008).

O TGF- β 1 é uma citocina fundamental na cicatrização que está diretamente envolvida com a indução da expressão da α -SMA de fibroblasto, sendo induzido já na fase inflamatória juntamente com outras citocinas. (ROBERTS et al., 2003). Por essa razão foi analisada a expressão de α -SMA dos tecidos de camundongos tratados por 3 dias com o complexo M1.

Além disso, foi analisada a expressão da α -SMA em tecidos tratados por 10 dias, pois os miofibroblastos possuem maior ação a partir da fase proliferativa. (AMADEU et al., 2008).

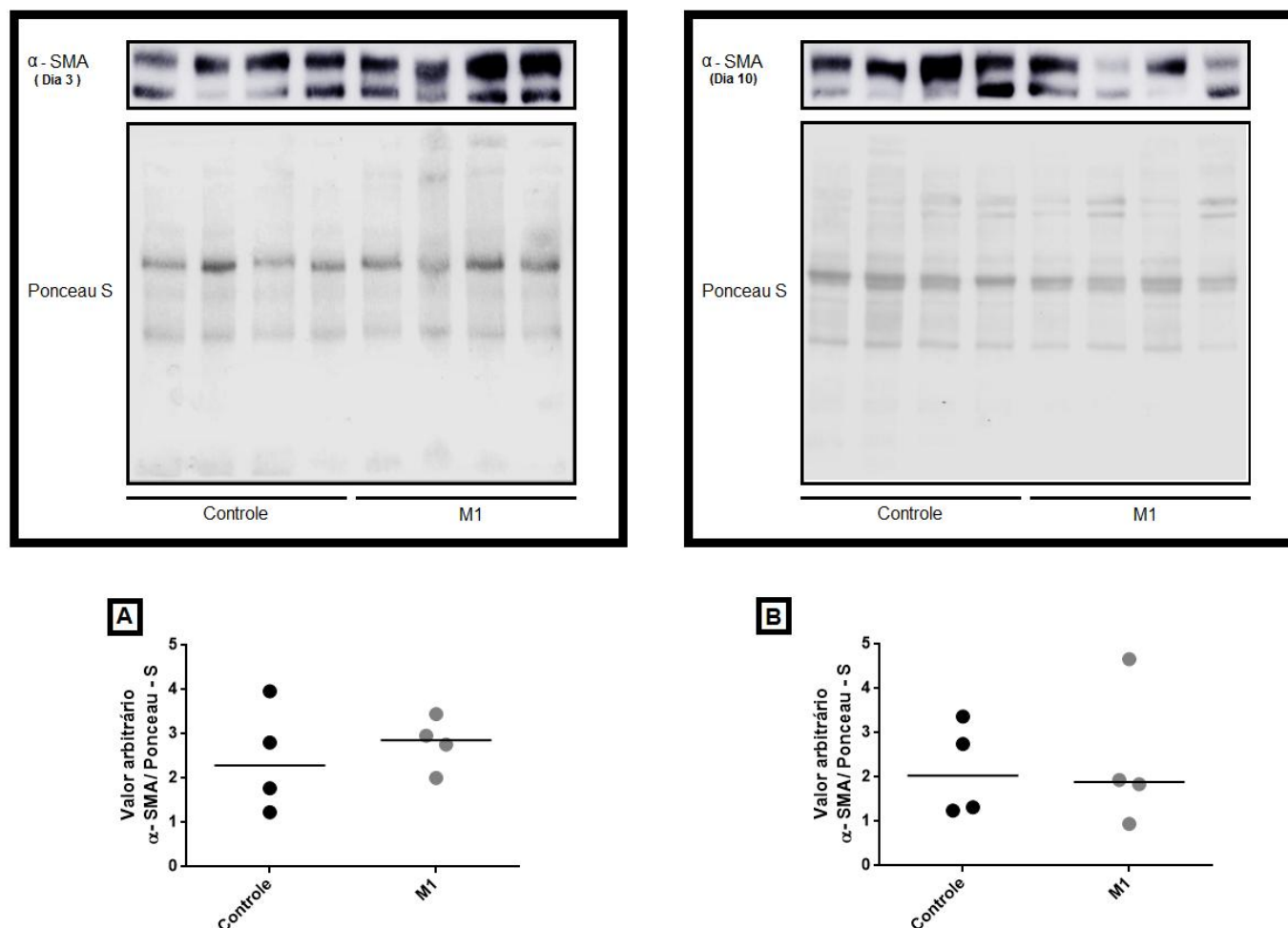
Nenhuma das amostras analisadas mostrou diferenças estatisticamente significativas quanto à expressão de α -SMA (FIGURA 6). Porém, devido a problemas encontrados na marcação com anticorpos para proteínas normalizadoras, a expressão foi normalizada pelo total de proteínas utilizadas para cada amostra.

Normalmente utiliza-se actina como gene normalizador, porém nesse caso não foi possível. A α -SMA é uma isoforma de actina que apresenta peso molecular de 42 - 47kDa (duas bandas) e a actina de 43kDa, sendo assim elas se encontram praticamente na mesma altura. Além disso, como as marcações apresentaram-se muito fortes não foi possível fazer a remarcação das membranas. Outras proteínas normalizadoras foram testadas, como a α -tubulina por exemplo, também sem sucesso. Sendo assim, para normalizar a expressão de α -SMA foi utilizada a quantificação total de proteínas

encontradas por amostra, utilizando o método de Ponceau S. Logo após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S, escaneadas, lavadas para remover o corante e incubadas com os anticorpos primário e secundário. Porém infelizmente não foi possível a imunomarcagem dessas membranas coradas.

As análises foram realizadas com uma membrana que mostra a expressão de α -SMA e normalizadas pelo Ponceau S realizado em outra membrana, apenas para ser possível comparação. Novos anticorpos devem ser utilizados como normalizadores, a fim de se obter o resultado definitivo. As membranas da expressão de α -SMA e na normalização são correspondentes as mesmas amostras e ao mesmo tempo de tratamento (3 e 10 dias).

FIGURA 6 - EXPRESSÃO DE ALFA-SMA EM PELE DERIVADA DE LESÃO EXPERIMENTAL POR EXCISÃO EM CAMUNDONGOS



A – Extrato proteico derivado de tecidos tratados com o complexo M1, por 3 dias. B - Extrato proteico derivado de tecidos tratados com o complexo M1, por 10 dias. Ambas as marcações tiveram a expressão da α -SMA avaliada através da separação das proteínas por eletroforese em gel de poliácridamida, transferência para membrana de nitrocelulose e imunomarcagem da banda utilizando anticorpo específico contra MMP-9, seguido de revelação através de substrato quimioluminescente de peroxidase. O grupo tratado foi comparado com o grupo controle. A marcação com

Ponceau- S foi utilizado como normalizador, porém a membrana de marcação é diferente da membrana da membrana utilizada para a normalização. A barra horizontal representa a mediana. Teste Mann- Whitney. $n=4$.

FONTE: O autor (2016).

Segundo Hinz (2007) a contração que é exercida pelos miofibroblastos é benéfica para a fase de remodelação, pois através dela ocorre um fechamento mais rápido e mais eficaz da ferida. Porém é prejudicial quando se torna excessivo, podendo formar cicatrizes hipertróficas. A ação contrátil dos miofibroblastos exercida pela α -SMA pode ser interrompida, levando a perda imediata da contração, através da liberação do estresse, podendo até promover a apoptose dos miofibroblastos, fazendo com que a ferida cicatrize mais lentamente. Como *in vivo* foi observado que o fechamento da ferida ocorreu mais rápido na presença do tratamento, isso pode indicar que não houve perda da contração dos miofibroblastos.

Para ensaios futuros seria interessante analisar a expressão de outras moléculas envolvidas na cicatrização, como por exemplo, o fator de crescimento transformante - $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), Smad 3, entre outras moléculas, que não foram possíveis de avaliar nesse trabalho, por falta de disponibilidade de mais anticorpos.

4.2 EXPRESSÃO DE VEGF

O VEGF foi marcado em membranas do dia 3, cujo anticorpo secundário utilizado foi anti-mouse (BD, 554002), porém a marcação não funcionou, mas não sabemos se é por conta do anticorpo ou porque não existia proteína suficiente para marcar. Seria interessante fazer um teste em um controle positivo, ou seja, em uma membrana que se tenha certeza que existe proteína suficiente a fim de testar qual foi o problema que ocorreu. Por essa razão, seria importante avaliar o anticorpo e a expressão dessa proteína, pois o VEGF exerce a função de sinalizar para que novos vasos sanguíneos sejam formados. Infelizmente para esse trabalho não houve tempo para tal investigação, mas num futuro próximo serão realizados os testes, e com sorte, serão realizadas os experimentos com as amostras.

4.3 EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES

As metaloproteinases representam uma família de enzimas zinco dependentes. Elas são secretadas na forma de pro-enzimas inativas, chamados de zimogênios. Quando são ativados, ocorre a quebra de uma ligação de cisteína zinco dependente, que faz com que o zimogênio se torne uma metaloproteinase ativa. (NAVARRO et al., 2006; GIBSON et al., 2009). Essas enzimas desempenham um papel importante na regulação da integridade, composição e degradação da MEC. (SANTORO; GAUDINO, 2005).

As MMPs 2 e 9 são sintetizadas e secretadas por diversos tipos celulares, entre eles os macrófagos, em que a principal função delas é degradar e modificar proteínas da MEC, que estão localizadas na margem e na matriz provisória do tecido, facilitando assim a migração celular. Esse mecanismo ocorre principalmente nas fases de proliferação e de remodelação, sendo caracterizada pela substituição do tecido de granulação por tecido cicatricial. As MMPs são importantes na remodelação e na reparação do tecido. (KUMAR et al., 2000).

As MMPs são reguladas principalmente a níveis transcricional e pós-transcricional, e dependem de ativadores e de inibidores para serem controladas. Os macrófagos além de secretarem as MMPs, produzem inibidores específicos de metaloproteinases teciduais, que são chamados de TIMPs 1 e 2 (BAUM; ARPEY, 2005), permitindo equilíbrio da função enzimática.

Foram analisadas as enzimas MMPs 2 e 9 a fim de verificar se o complexo M1 alterava sua expressão em tecidos colhidos após 10 dias de tratamento no modelo de excisão da pele, uma vez que a degradação da MEC provavelmente já está se iniciando após esse período (fase proliferativa).

As MMPs 2 e 9 tiveram a expressão verificada através de ensaios de *Western Blotting* utilizando substrato quimioluminescente da peroxidase, que quando combinado com a enzima, produz luz como um subproduto tornando a banda visível.

4.3.1 MMP-2

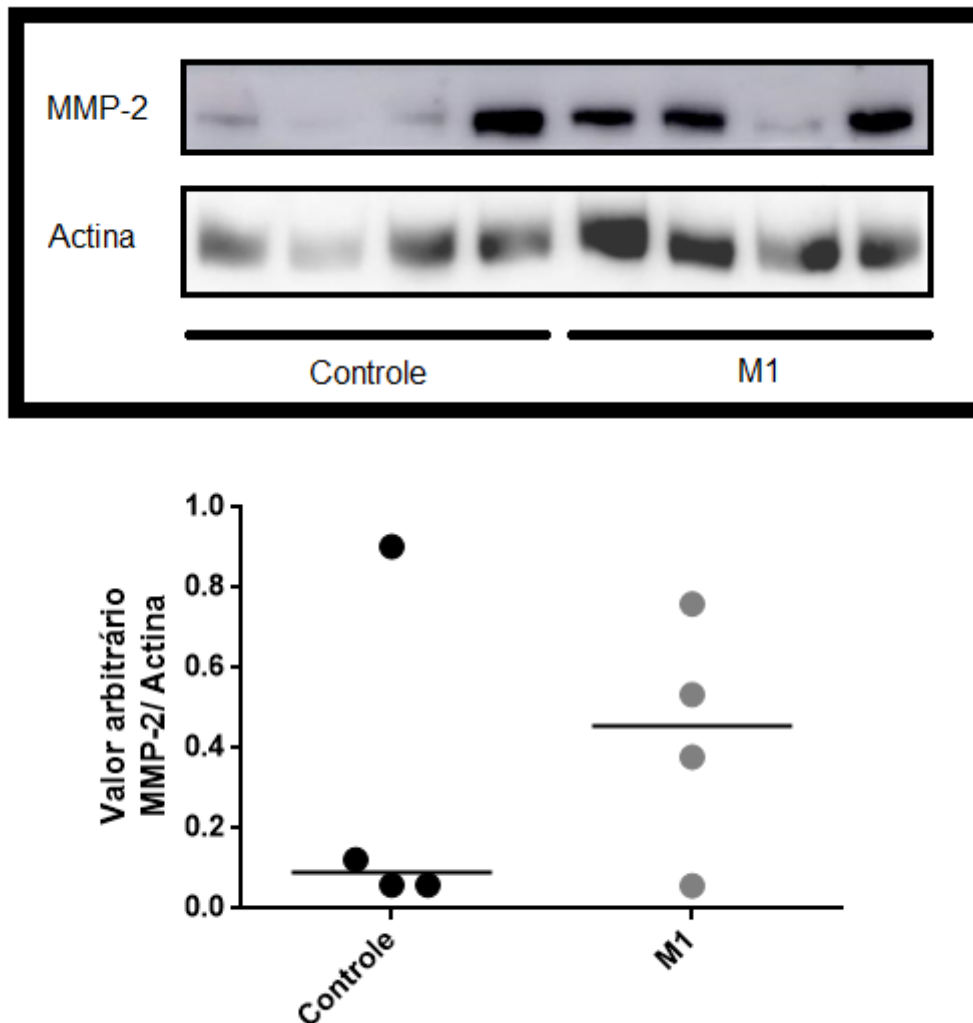
A MMP-2 é uma metaloproteinase da MEC, pertencente a subclasse gelatinase A. Ela é responsável por atuar nos colágenos IV, V, VII, X, elastina e fibronectina. (SANTOS et al., 2012). O tecido de camundongos tratados por 10 dias com o complexo M1, e analisado nesse trabalho, não mostrou diferença estatisticamente significativa na expressão de MMP-2. Para a comparação foram

utilizadas amostras de tecido de camundongos submetidos ao modelo de excisão, e que receberam apenas o veículo do tratamento (FIGURA 7).

MMP-2 é uma molécula importante para a que ocorra a cicatrização. Mira (2011) avaliou lesões cutâneas causadas por leishmaniose tegumentar americana (LTA), cujo tratamento foi com o medicamento Glucantime®. Ela correlacionou a falha terapêutica do medicamento com a baixa expressão da gelatinase MMP-2. Os pacientes foram separados em 2 grupos, os que tinham boa resposta ao medicamento e os que tinham má resposta ao medicamento. Com isso foi possível observar que ocorria uma transcrição maior de mRNA para a MMP-2 em lesões de pacientes que respondiam bem ao tratamento.

McLennan, Min e Yue (2008) avaliaram a atividade das metaloproteinases de MEC, como marcadores e mediadores de cicatrização de feridas de diabéticos, a fim de verificar se as MMPs estão envolvidas na diminuição da velocidade da cicatrização de feridas, nessa patologia. As análises foram realizadas através do ensaio de zimografia, em feridas que cicatrizaram e feridas que não cicatrizaram. A expressão de MMPs mostrou-se variável em diferentes fases da cicatrização, em que nas feridas que cicatrizaram, no tempo inicial (1 dia) apresentaram uma maior atividade de MMP-9 e uma baixa atividade de MMP-2, porém no tempo de 22 dias a atividade de MMP-2 foi maior em comparação com a MMP-9 do mesmo tempo. Já em feridas que não cicatrizaram a atividade da MMP-9 foi maior que a atividade da MMP-2 em todos os tempos. Mostrando assim que essa variação entre MMP-9 e MMP-2 é importante para a cicatrização e que quando a atividade da MMP-2 é reduzida em relação a MMP-9, na fase de proliferação ou remodelação, o processo de cicatrização é prejudicado.

FIGURA 7- EXPRESSÃO DE MMP-2 EM PELE DERIVADA DE LESÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS



Tecidos tratados com o complexo M1, por 10 dias, tiveram a expressão da MMP-2 avaliada através da separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida, transferência para membrana de nitrocelulose e imunomarcagem da banda utilizando anticorpo específico contra MMP-2, seguido de revelação através de substrato quimioluminescente de peroxidase. O grupo tratado foi comparado com o grupo controle (tratado com o veículo). A actina foi utilizada como proteína normalizadora. A barra horizontal representa a mediana. Teste Mann-Whitney. $n = 4$.

FONTE: O autor (2016)

Como não foi possível observar aumento estatisticamente significativo na expressão de MMP-2 após o tratamento com o complexo M1, quando comparado com o controle, pode-se supor que:

1. O número de amostras é relativamente pequeno. Uma vez que a variação entre os animais foi grande, o teste estatístico não consegue determinar significância nos resultados. Por essa razão os experimentos poderiam ser repetidos a fim de confirmar, ou não, esse resultado. Caso esse

experimento seja repetido seria interessante levar em consideração o pH da lesão, pois não foi levado em consideração no estudo feito por Gonçalves (2013).

Segundo Gethin, Cowman e Conroy (2008) a ação da MMP-2 depende do pH do meio. Um estudo realizado por Santos e colaboradores (2012) mostra que a MMP-2 é importante para a degradação MEC, e que o pH do microambiente da lesão é importante para a melhor atividade da MMP-2. Segundo eles o pH ideal para o melhor desempenho da MMP-2 é 8,0 e quando ocorre uma diminuição do pH na lesão pode ocorrer uma redução de 40 a 90% na atividade da MMP-2, e por mais que haja uma expressão grande de MMP-2 no local da ferida, sua atividade fica diminuída. Caso o experimento venha a ser repetido futuramente o pH seria um fator importante a ser levado em conta, assim como a atividade das enzimas.

2. A atividade da enzima pode estar sendo alterada, sem ocorrer alteração na sua produção.

Pode ser que o complexo M1 altere a atividade da proteína, para isso seria interessante realizar o ensaio de zimografia, que é um ensaio que permite verificar se a atividade da MMP-2 está sendo modificada pelo complexo M1, através da degradação do substrato copolimerizado juntamente com os géis de eletroforese, pela proteína observada, neste caso a MMP-2. Após a corrida o gel é corado com azul de Coomassie em que o gel todo fica azul e o local onde a proteína degradou fica branco, notando-se a banda nessa região do gel. A intensidade da banda gerada pode ser relacionada à quantidade de proteína ativa. (TOTH; FRIDMAN, 2001).

Silva e colaboradores (2014) avaliaram a atividade enzimática das MMP-2 e 9, de amostras retiradas de úlceras venosas de membros inferiores através do ensaio de zimografia. As amostras foram extraídas, com um *swab*, do exsudato de úlcera venosa (UV), em diferentes fases da cicatrização. As amostras foram separadas em géis de poliacrilamida na concentração de 8% de Acrilamida/ Bisacrilamida (Bio-Rad®), 0,1% SDS, pH 8,8 e contendo 1 mg/mL de gelatina (de pele suína, tipo A,G2500 - Sigma-Aldrich®). As bandas correspondentes às formas latente e ativa de cada enzima foram selecionadas e quantificadas por densitometria. Ambas as MMPs apresentaram atividade gelatinolítica, porém a MMP-2 apresentou uma menor atividade em comparação com a MMP-9.

Além disso, seria importante verificar outras MMPs que também são importantes para o processo da cicatrização, assim como ativadores delas. Seriam eles o TNF- α e o TGF- β 1, que induzem a expressão de MMP-1, que é muito importante para a regeneração do tecido, assim como a MMP-10. A expressão de MMP-2 em queratinócitos é modulada pelo TGF- β 1, que seria um fator importante a

ser estudado. Já a MMP-10 auxilia da migração dos queratinócitos e também contribui para a remodelação da MEC. Além disso, a MMP-10 pode ativar a MMP-9. (SANTORO; GAUDINO, 2005).

Também, seria interessante verificar a expressão de TIMPs, que são inibidores das metaloproteinases, através da modulação delas. As TIMPs são moléculas que contribuem para diversos processos biológicos, dentre eles angiogenese. (CALEY; MARTINS; O'TOOLE, 2015).

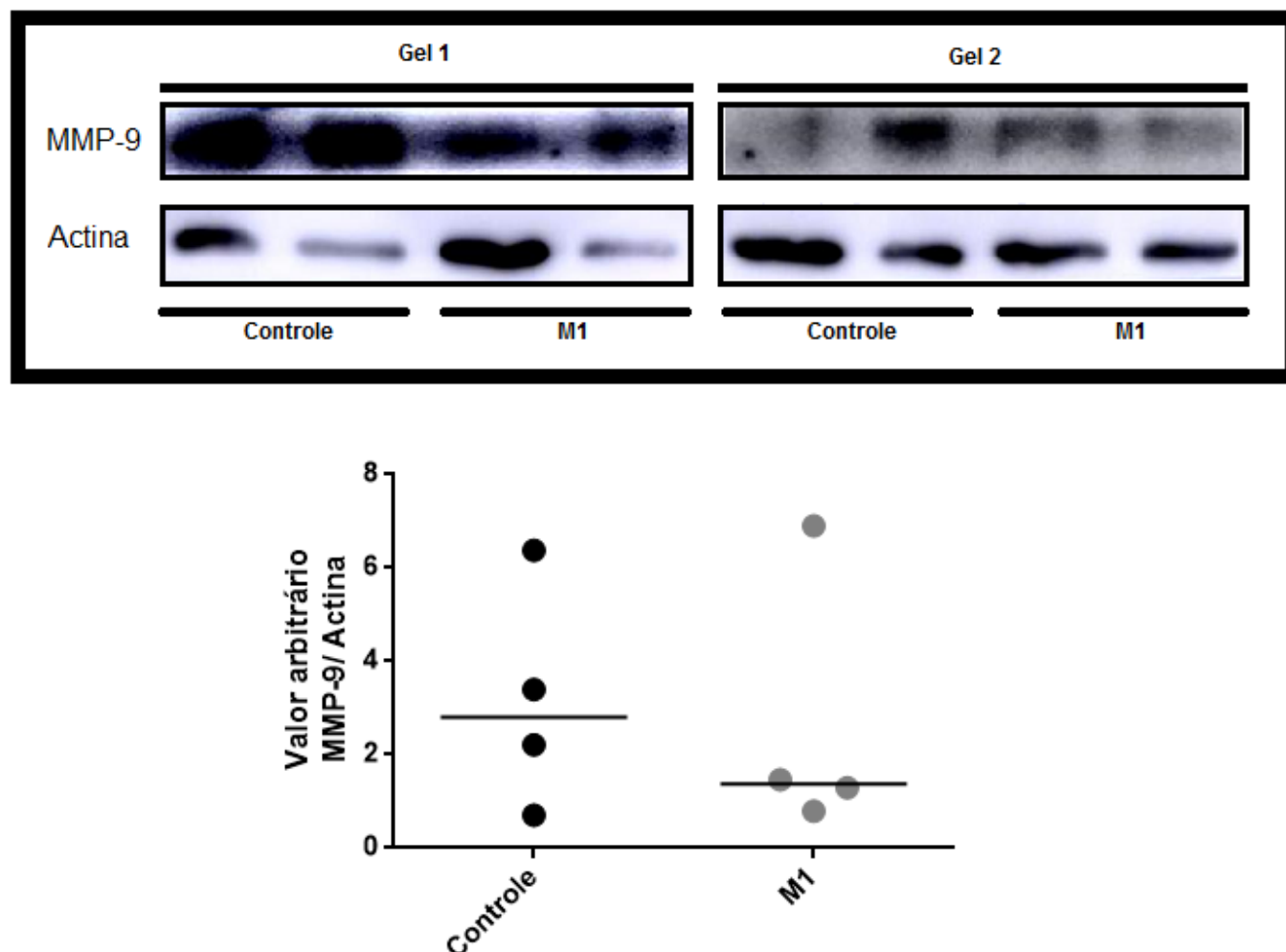
3. O aumento da velocidade de fechamento da ferida observada *in vivo*, é decorrente de outra molécula envolvida na cicatrização.

Já que a MMP- 2 não foi alterada estatisticamente pelo complexo M1, continuamos com a investigação de outras moléculas envolvidas na cicatrização, onde a expressão das mesmas pudesse ser modificada pelo complexo M1, explicando o resultado observado *in vivo*. Dessa forma, posteriormente estudaremos a expressão da MMP-9 nos tecidos.

4.3.2 MMP-9

A MMP-9 é uma metaloproteinase pertencente a subclasse gelatinase-B. Ela é responsável por degradar a MEC, degradando o tecido de granulação para que o tecido cicatricial seja formado. Esta metaloproteinase atua nos colágenos IV, V, VII, X, elastina e fibronectina. (SANTOS et al., 2012). O tecido dos camundongos tratados por 10 dias com o complexo M1, e analisado nesse trabalho, não apresentou diferenças estatisticamente significativas quanto à expressão de MMP-9 (FIGURA 8).

FIGURA 8 - EXPRESSÃO DE MMP-9 EM PELE DERIVADA DE LESÃO EXPERIMENTALEM CAMUNDONGOS



Amostras de tecido tratados com o complexo M1, por 10 dias, tiveram a expressão da MMP-9 avaliada através da separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida, transferência para membrana de nitrocelulose e imunomarcagem da banda utilizando anticorpo específico contra MMP-9, seguido de revelação através de substrato quimioluminescente de peroxidase. O grupo tratado foi comparado com o grupo controle (veículo). A actina foi utilizada como proteína normalizadora. A barra horizontal representa a mediana. Teste Mann-Whitney. $n=4$

FONTE: O autor (2016)

A expressão da MMP-9 vem sendo estudada há anos em processos de lesão cutânea. (GIBSON et al., 2009). Muitos grupos de pesquisadores mostram que a quantidade de MMP-9 está relacionada com o aumento da velocidade de fechamento de uma ferida, em que quando uma lesão apresenta elevados níveis de MMP-9 a velocidade de fechamento é menor, tendo assim uma cicatrização mais lenta. (GIBSON et al., 2009).

Liu e colaboradores (2009) tiveram por objetivo verificar a expressão da MMP-9 e outras moléculas, no fluido obtido a partir de úlceras do pé de diabéticos, a fim de estudar suas relações com a cicatrização de lesões cutâneas. Os pacientes foram caracterizados como neuropáticos, pós

cirúrgicos ou neuroisquêmicos. A maioria dos pacientes apresentava diabetes do tipo 2 e todos foram observados semanalmente para desbridamento e outros tratamentos durante 4 semanas. Além disso, 83% dos pacientes foram tratados com antibioticoterapia. As amostras foram coletadas e analisadas a partir da quarta semana de tratamento e observação. Pacientes que tiveram o fechamento completo da ferida em 12 semanas apresentavam a expressão de MMP-9 estatisticamente menores que pacientes que não tiveram a ferida fechada em 12 semanas. Esses resultados sugerem que a maior quantidade de MMP-9 está relacionada com o retardo da cicatrização causando, uma cicatrização mais lenta.

Assim como na análise da expressão de MMP-2, o resultado observado apesar de não estatisticamente significativo, pode ser devido ao número reduzido de amostras utilizadas no trabalho de Gonçalves (2013). Outro fato a ser considerado, é que o aumento da velocidade de cicatrização observado *in vivo*, seja decorrente da ação de outra (s) molécula (s) envolvida (s) na cicatrização.

Sedo assim, já que a MMP- 9 não foi alterada estatisticamente pelo complexo M1, buscamos continuar com a investigação verificando se o complexo M1 era capaz de modificar a capacidade migratória ou proliferativa de fibroblastos, que pudessem explicar o resultado observado *in vivo*.

4.4 CICATRIZAÇÃO *IN VITRO*

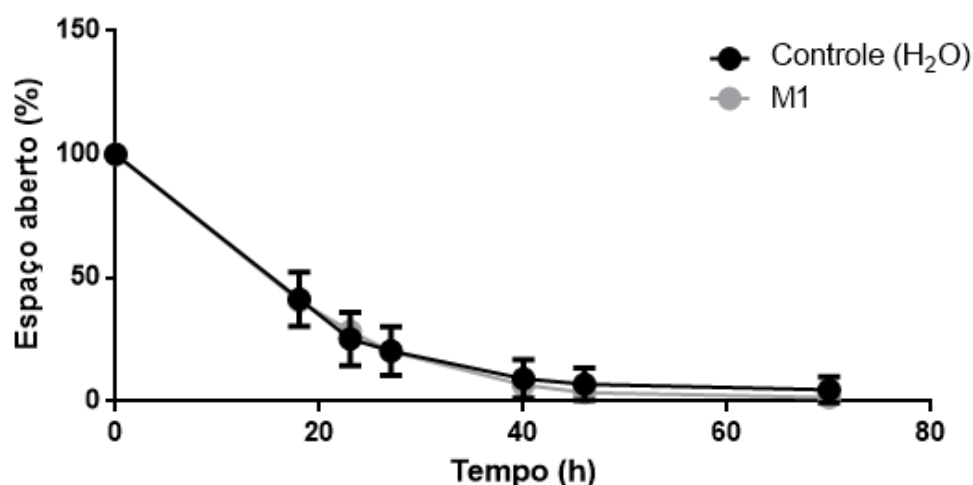
Esse ensaio foi realizado com o intuito de mimetizar a cicatrização *in vivo*. Uma vez que foi observado aumento na velocidade de cicatrização *in vivo*, o aumento na migração celular de fibroblastos poderia ser uma possibilidade do mecanismo de ação do complexo M1 (FIGURA 9).

O ensaio de cicatrização *in vitro* utilizando células de fibroblastos (Balb/3T3), foi avaliado através do ensaio "scratch". As células começaram a ser tratadas após o risco ser feito e foram tratadas de 24h em 24h até o risco fechar. As células tratadas com M1 não mostraram nenhuma diferença estatisticamente significativa com relação ao controle (tratado com H₂O), no que diz respeito a migração celular , ou seja, não apresentou um preenchimento mais rápido do risco. (GRÁFICO 1).

Li e colaboradores (2004) realizaram o ensaio de cicatrização *in vitro* com fibroblastos dérmicos humanos, a fim de verificar se o grupo tratado apresentava um aumento de velocidade de fechamento do risco. Foi utilizada mitomicina C (10 µg/ml) no grupo tratado e no grupo controle, a fim de impedir a proliferação celular. Os poços tratados foram revestidos com colágeno (45 µg/ml) e os poços controle foram revestidos com polilisina (30 µg/ml), então os fibroblastos foram plaqueados e mantidos em condições ideais até atingirem 100% de confluência. Após isso os riscos foram realizados e o meio contendo FBS a 0,2% sem ou com PDGF-BB foi adicionado em cada poço de ambos os grupos,

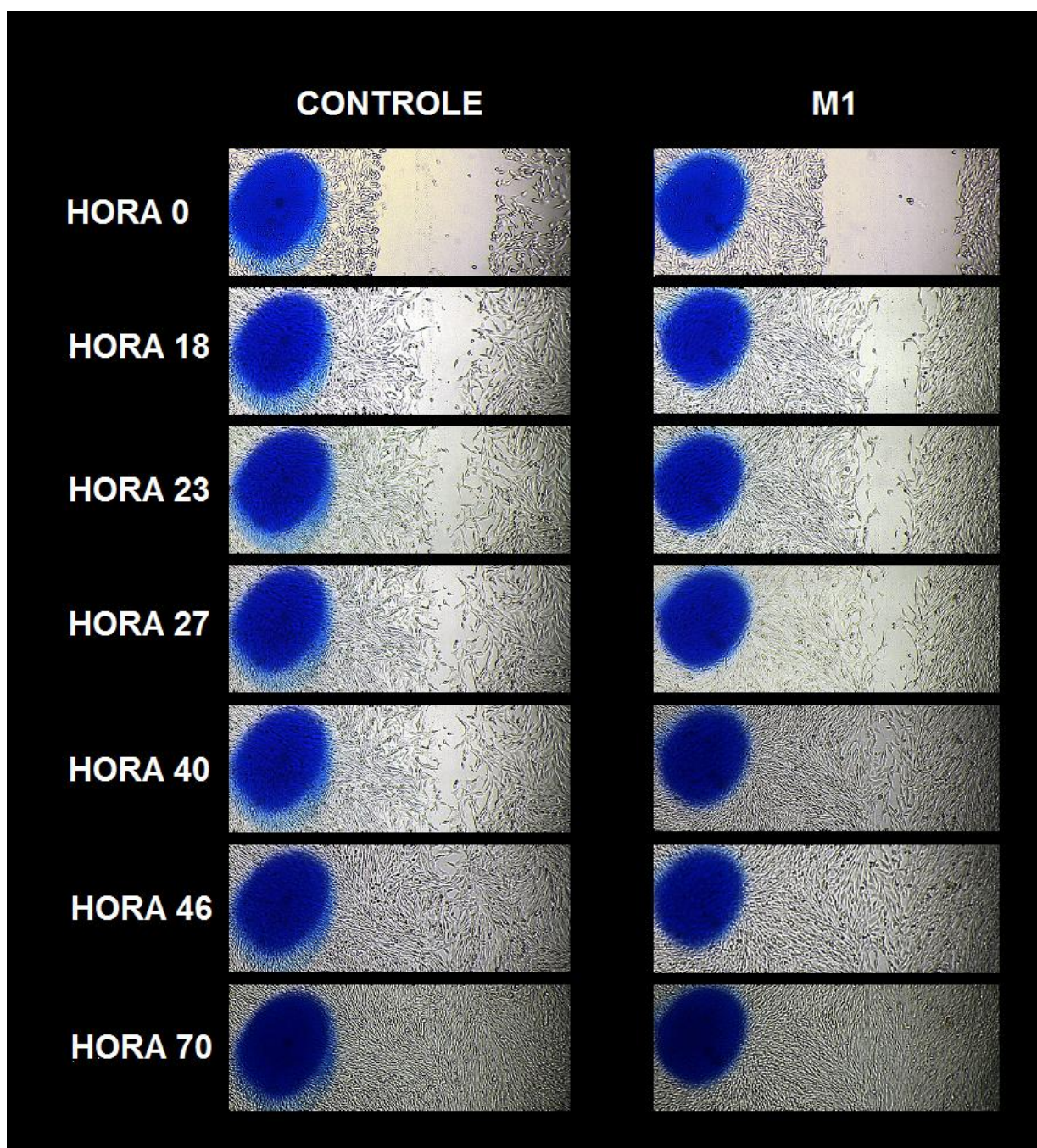
tratados e controle. Segundo o resultado obtido por eles foi possível observar que as células que receberam uma camada de colágeno e o meio era suplementado com PDGF-BB, migraram mais rápido que as células controle, que receberam uma camada de polilisina no poço e também foram suplementadas com PDGF. Já as células que receberam uma camada de colágeno e o meio não era suplementado com PDGF-BB, não apresentaram diferença em comparação com as células controle, que receberam uma camada de polilisina no poço e também não foram suplementadas com PDGF. Mostrando assim que o tratamento com colágeno e PDGF-BB é capaz de aumentar a velocidade de cicatrização *in vitro*, em fibroblastos humanos.

GRÁFICO 1- CICATRIZAÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO LINHAGEM CELULAR BALB/3T3



Células tratadas, com M1 ou veículo até o fechamento completo do risco, tiveram a sua cicatrização avaliada pelo ensaio de cicatrização *in vitro* "scratch". O grupo tratado foi comparado com o grupo controle de cada tempo. Cada ponto representa a média em porcentagem de 5 experimentos independentes realizados em duplicata técnica, com o desvio padrão. Teste Mann-Whitney.

FONTE: O autor (2016).

FIGURA 9 - CICATRIZAÇÃO *IN VITRO*

Ensaio de cicatrização *in vitro* "scratch", realizado com fibroblastos murinos Balb/3T3, onde foi observado o fechamento do risco durante o tratamento, nos tempos de: 0h, 18h, 23h, 27h, 40h, 46h e 70 h.

FONTE: O autor (2016)

A partir do resultado obtido foi possível observar que o complexo M1 não altera a velocidade de cicatrização, uma vez que o tempo de migração dos fibroblastos mostrou-se igual para as duas condições (controle e tratado). Porém, o resultado *in vivo* se dá a partir de tecidos complexos. Uma vez que outros tipos celulares estão presentes, esse resultado pode ser devido a modificações em outras

células envolvidas no processo de cicatrização, como por exemplo os miofibroblastos ou até mesmo os queratinócitos, que são células que estão em maior abundância no tecido. O ensaio de cicatrização não foi realizado com queratinócitos, por falta de disponibilidade momentânea dessas linhagens celulares. Porém no futuro, serão realizados experimentos com outros tipos celulares com o intuito de verificar essa hipótese.

Além disso, no trabalho realizado por Gonçalves (2013), é possível observar um aumento na velocidade de fechamento da epiderme das peles tratadas com M1, no ensaio de incisão e sutura com fio não absorvível. Na epiderme encontram-se grande parte dos queratinócitos e isso pode ser um indicio de que aumento da velocidade de cicatrização observada *in vivo* seja por proveniente da modificação dos queratinócitos pelo M1.

4.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR

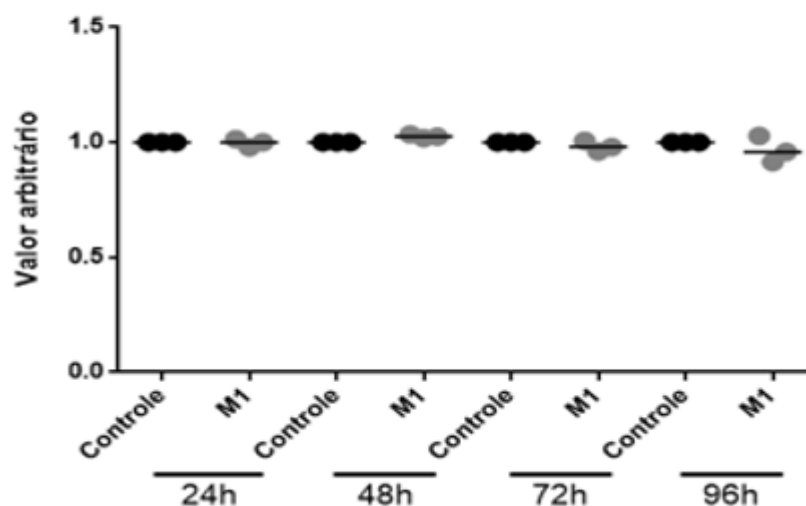
Esse ensaio foi realizado a fim de utilizar como normalizador nos ensaios de funcionalidade dos fibroblastos.

A proliferação celular, de células de fibroblastos (Balb/3T3), foi avaliada através do ensaio de cristal violeta. As células tratadas com M1 não mostraram nenhuma diferença significativa quanto à proliferação celular, em nenhum dos tempos (24, 48, 72 e 96h) de tratamento nos experimentos realizados, corroborando experimentos realizados por Gonçalves 2016. (GRÁFICO 2).

O ensaio utilizando o corante cristal violeta é comumente utilizado para avaliar a proliferação celular, causada por medicamentos, biomateriais entre outros. Por exemplo, Mota e colaboradores (2014) avaliaram a proliferação celular dos fibroblastos NIH-3T3 através do ensaio de cristal violeta, a fim de verificar se o cimento ionômero de vidro (CIV) quimicamente ativados, que é um material oxirresinoso, causava alterações na proliferação das células, quando comparados com o grupo controle, que não recebeu nenhum tipo de material. Segundo os resultados obtidos por eles o CIV causava uma alteração quanto ao número de células viáveis, em que ocorria uma redução delas.

Como a proliferação celular não mostrou diferenças após o tratamento com o complexo M1, comparado com o controle (H₂O), pode-se supor que o fechamento mais rápido da ferida pode ser decorrente da modificação de outro tipo celular, como os queratinócitos, que são abundantes na epiderme.

GRÁFICO 2 - PROLIFERAÇÃO CELULAR DE FIBROBLASTOS (Balb/3T3)



Células tratadas com M1, por 24, 48, 72 e 96 horas tiveram a sua proliferação avaliada pelo ensaio de cristal violeta. O grupo tratado foi comparado com o grupo controle de cada experimento. Cada ponto representa a média de triplicatas técnicas de um experimento, portanto 3 experimentos independentes foram realizados. A barra horizontal representa a mediana. Teste Mann-Whitney.

FONTE: O autor (2016)

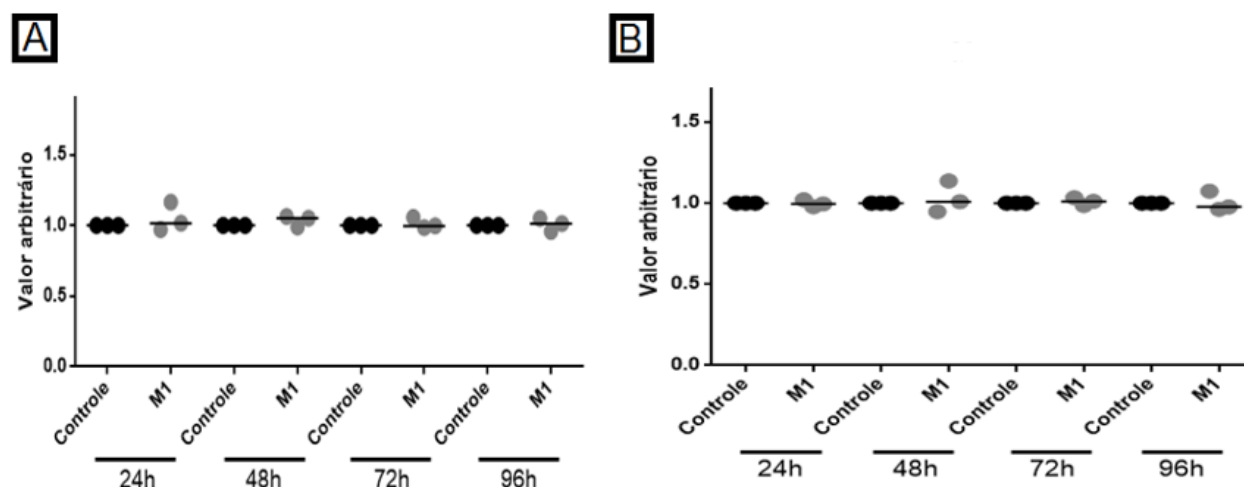
4.6 FUNCIONALIDADE CELULAR

Os CNAD assim como qualquer medicamento ou biomaterial pode causar alterações celulares prejudiciais para o organismo. Por essa razão os ensaios de funcionalidade celular, vermelho neutro e MTT, foram realizados com o objetivo de visualizar se o complexo M1 era seguro para a utilização na pele, ou seja, se não apresentava efeitos citotóxico alterando a viabilidade da célula.

O ensaio de vermelho neutro foi realizado a fim de determinar a capacidade de retenção do corante pelas células viáveis. (BORENFREUND; PUERNER, 1985). E o ensaio de MTT foi realizado na tentativa de verificar possíveis danos induzido pelo complexo na funcionalidade mitocondrial. (MOSSMAN, 1983).

Células de fibroblasto (Balb/3T3) tratadas com M1 não mostraram nenhuma diferença significativa quanto à alteração na funcionalidade lisossomal e mitocondrial, em nenhum dos tempos (24, 48, 72 e 96h) de tratamento nos experimentos realizados (GRÁFICO 3).

GRÁFICO 3- ANÁLISE DE FUNCIONALIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM M1



A – Ensaio de retenção do corante vermelho neutro - células de fibroblastos da linhagem balb/3T3 tratadas com M1 por 24, 48, 72 e 96 horas tiveram a sua viabilidade lisossomal avaliada pelo ensaio de vermelho neutro. Os dados foram normalizados pelos resultados de cristal violeta. B – Ensaio de atividade mitocondrial através da redução de MTT - células de fibroblastos da linhagem balb/3T3 tratadas com M1 por 24, 48, 72 e 96 horas tiveram a sua atividade mitocondrial avaliada pelo ensaio de MTT. Cada ponto representa a média de triplicatas técnicas de um experimento, portanto 3 experimentos independentes foram realizados, normalizados pelos resultados de cristal violeta. A barra horizontal representa a mediana. Teste Mann-Whitney.

FONTE: O autor (2016)

O ensaio de MTT é um dos mais utilizados para determinação de citotoxicidade, podendo ser usado para monocamadas ou preparações de células em suspensão. Porém, apresenta desvantagens como a impossibilidade de manter vivas as células em cultura após a realização do ensaio. (Al-Nasiry et al., 2007). Além disso, nos ensaios de viabilidade, como MTT e vermelho neutro, as células estão aderidas nas placas, sendo assim não foram levadas em conta as células que possam ter vindo a se soltar ou tenham morrido, pois o método não possibilita essa distinção.

No caso do CNAD M1 o resultado apresentado é favorável pois quanto menos o complexo M1 causar alterações de viabilidade nas células, menos danos ao organismo causará.

Como o complexo é aplicado diretamente na pele, através do gel, é importante que ele não cause alterações celulares, deixando as células inviáveis, pois o foco é a melhoria do tecido lesionado. Com o resultado obtido é possível sugerir que o complexo M1 é seguro para a utilização na pele, já que não causa perda de viabilidade celular.

5 CONCLUSÃO

- O tratamento *in vivo* com M1 na forma de gel não alterou significativamente a expressão das metaloproteinases 2 e 9 e da α -SMA nas células da pele de camundongos submetidos ao modelo de cicatrização por excisão.
- O tratamento *in vitro* com M1 por até 70 horas não alterou a capacidade cicatrizante/migratória de fibroblastos murinos Balb/3T3.
- O tratamento com M1 não altera a funcionalidade normal da célula, sugerindo ser seguro para uso em cicatrizações cutâneas.

REFERÊNCIAS

- AL-NASIRY, S., GEUSENS, N., HANSSENS, M., LUYTEN, C., PIJNENBORG, R., The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**. v. 22, n. 5, p. 1304–1309, Fev. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17307808>>.
- AMADEU, T. P.; SEABRA, A. B.; OLIVEIRA, M. G.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Nitric Oxide Donor Improves Healing if Applied on Inflammatory and Proliferative Phase. **Journal of Surgical Research**. v. 149, n.1, p. 84 –93, Set. 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022480407006373>>.
- ASHCROFT, G.S., YANG, X., GLICK, A.B., WEINSTEIN, M., LETTERIO, J.J., MIZEL, D.E., ANZANO, M., GREENWELL-WILD, T., WAHL, S.M., DENG, C., ROBERTS, A.B., Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. **Nature Cell Biology**. v.1, p. 260–266. Set. 1999. Disponível em: <http://www.nature.com/ncb/journal/v1/n5/full/ncb0999_260.html>.
- ATALA, A., IRVINE, D. J., MOSES, M., SHAUNAK, S. Wound Healing Versus Regeneration: Role of the Tissue Environment in Regenerative Medicine. **MRS BULLETIN**. v. 35, n. 8, p.1-22. Ago. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3826556/#!po=16.6667>>.
- BAUM, C.L., ARPEY, C.J. Normal cutaneous wound healing: Clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic Surgery**, v. 31, p. 674–686, Jun. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15996419>>.
- BARBUL, A., BRESLIN, J.R., WOODYARD, J.P., WASSERKRUG, H. L., EFRON, G. The effect of in vivo T helper and T suppressor lymphocyte depletion on wound healing. **Ann Surg**. v. 209, p. 479-483. 1989. Disponível em: <http://www.neuro.ki.se/neuro/KK2/Jimmy_GoogleCACHE1.html>.
- BORENFREUND, E., PUERNER J.A., Toxicity Determined In Vitro By Morphological Alterations and Neutral Red Absorption. **Toxicology Letters**, v. 24, p.119-124. 1985. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378427485900463>>.
- CALEY, M. P., MARTINS, V. L. C., O'TOOLE, E. A., Metalloproteinases and Wound Healing. **Advances in Wound Care** (New Rochelle). v. 4, n. 4, p. 225–234. Abr.2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4397992/>>.
- CHAPONNIER, C., DESMOULIÈRE, A., GABBIANI, G., Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. **Landes bioscience journal**, v. 13 n.1, p. 7-12, Jan. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15659031>>.
- CHERNG, S., YOUNG, J., MA H. Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA). **The Journal of American Science**. v. 4, n. 4, p. 7 - 9, 2008. Disponível em: <http://www.jofamericanscience.org/journals/am-sci/0404/02_0405_mahongbao-sma_am.pdf>.
- COMBADIÈRE, B., LIARD, C. Transcutaneous and intradermal vaccination. **Human Vaccines**, v. 7, n. 8, p. 811–827, Ago. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21817854>>.

DARBY, I. A., LAVERDET, B., BONTÉ, F., DESMOULIÈRE, A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. Clinical, **Cosmetic and Investigational Dermatology**. v. 7, p. 301-311, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4226391/>>.

DELAVERY, B. M., WILLEM, M., VEERA, V. D., EGMONDA, M. V., NIESSEN, F.B., BEELENA, R. H.J. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**, v. 216, n. 7, p. 753-62, Jul. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21281986>>.

DIETER, M. F. **Ação do medicamento CANOVA na cicatrização do dorso de camundongos após incisão e sutura: avaliação macro e microscópica**. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

DIPIETRO, L. A. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 100, n. 5, p. 979-984, Nov. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27406995>>.

EMING, S. A., HAMMERSCHMIDT, M., KRIEG, T., ROERS, A. Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. v. 20, n. 5 p.517–527, Abr 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393325>>.

ENOCH, S., LEAPER, D.J. Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*. v. 23, n. 2, p. 37-42. Fev. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263931906700679>>.

FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA., v. 3a edição, 2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a_edicao.pdf>. Acessado: 04/05/16.

GANTWERKER, E. A., HOM, D. B. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. *Facial Plastic Surgery Clinics North America*. v. 19, n. 3, p. 441-453, Ago.2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21856533>>.

GONZALEZ, A. C. O., COSTA, T. F., ANDRADE, Z. A., MEDRAD, A. R. A. P. Wound healing - A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. v. 91, n. 5, p.614-620. Set. 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abd/v91n5/0365-0596-abd-91-05-0614.pdf>>.

GETHIN, G.T., COWMAN, S., CONROY, R.M. The impact of Manuka honey dressings on the surface pH of chronic wounds. *International Wound Journal*. v. 5, n. 2, p. 185 -194. Jun 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18494624>>.

GIBSON, D., CULLEN, B., LEGERSTEE, R., HARDING, K. G., SCHULTZ, G. MMPs made easy. **Wounds International**, v. 1, n. 1, p.1-6, Nov. 2009. Disponível em: <http://www.woundsinternational.com/media/issues/61/files/content_21.pdf>.

GILLIES, R. J., DIDIER, N., DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Analytical Biochemistry**, v.159, n. 1, p.109-113. Nov. 1986. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3812988>>.

GONÇALVES, J. P. **Ação de complexos naturais altamente diluídos no processo de cicatrização de feridas na pele em camundongos**. 46f. Trabalho de Graduação (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

GONÇALVES, J. P. **Complexos Naturais Altamente Diluídos Alteram Parâmetros De Malignidade Em Melanoma Murino**. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2016

GURTNER, G.C., WERNER, S., BARRANDON, Y., LONGAKER, M.T., Wound repair and regeneration. **Nature**. v. 453, n. 15, p.314–321, Maio 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v453/n7193/full/nature07039.html>>.

HARPER, D., YOUNG, A., MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. **Surgery** (Oxford) v. 32, n. 9, p. 445-450, Set. 2014. Disponível em: <[http://www.surgeryjournal.co.uk/article/S0263-9319\(14\)00134-3/abstract](http://www.surgeryjournal.co.uk/article/S0263-9319(14)00134-3/abstract)>.

HINZ, B., CELETTA, G., TOMASEK J. J., GABBIANI, G., CHAPONNIER C. Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity. **Molecular Biology of the Cell**. v. 12, p. 2730–2741, Set 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC59708/>>.

HINZ, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 127, n. 3, p. 526-537, Mar. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17299435>>.

KALLURI, R., NEILSON, E.G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 112, p.1776–1784, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679171>>.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European journal of dermatology**, v. 12, n. 4, p. 390–401, Jul. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12095893>>.

KUMAR, R., XIE, K., EUE, I., DONG, Z., KILLION, J.J., FIDLER, J.I. Differential regulation of type iv collagenases and metalloelastase in murine macrophages by the synthetic bacterial lipopeptide JBT 3002. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 22, n. 6, p. 431-443. Jun. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10727754>>.

LANDÉN, N.X., LI, D., STÄHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 73, n. 20, p. 3861-3885, Mai. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27180275>>.

LI, G., LI, Y. Y., SUN, J. E., LIN, W. H., ZHOU, R. X. ILK–PI3K/AKT pathway participates in cutaneous wound contraction by regulating fibroblast migration and differentiation to myofibroblast. **Laboratory Investigation**, v. 96, p. 741–751. Mar. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/labinvest/journal/v96/n7/full/labinvest201648a.html>>.

LI, W., FAN, J., CHEN, M., GUAN, S., SAWCER, D., BOKOCH, G. M., WOODLEY D.T. Mechanism of Human Dermal Fibroblast Migration Driven by Type I Collagen and Platelet-derived Growth Factor-BB. **Molecular Biology Of The Cell**. v.15, n. 1, p. 294-309. Jan. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC307548/>>.

LIANG, C. C., PARK, A., GUAN, J. L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature Protocols**. v.2, p. 329 – 333. Mar. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/nprot/journal/v2/n2/full/nprot.2007.30.html>>

LIU, Y., MIN, D., BOLTON, T., NUBÉ, V., TWIGG, S. M., YUE, D. K., MCLENNAN, S. V. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. **Diabetes Care**. v. 32, n. 1, p. 117- 119, Jan. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18835949>>.

LOPES, L., GODOY, L. M. F., OLIVEIRA, C. C., SCHADECK, R.J.G., BUCHI, D.F. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron** (Oxford, England: 1993), v. 37, n. 3, p.277–287, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16364649>>.

LUCAS, T., WAISMAN, A., RANJAN, R., ROES, J., KRIEG, T., MÜLLER, W., ROERS, J., KRIEG, T., ROERS, A., EMING S. A. Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. **The Journal of Immunology**. v.184, p. 3964-3977, Fev. 2010. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/184/7/3964.full.pdf>>

MAHMOOD, T., YANG, P. C., Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. **North American Journal of Medical Sciences**, v.4, n. 9, p. 429-434, Set. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23050259>>.

MACLEOD, A. S.; HAVRAN, W. L. Functions of skin-resident $\gamma\delta$ T cells. **Cellular and molecular life sciences**, v. 68, n. 14, p. 2399-2408, Jul. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21560071>>.

MADLENER, M., PARKS, W.C., WERNER, S. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. **Exp. Cell Res.** v. 242, n. 1, p. 201–210, Jul. 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665817>>.

MARTINEZ-FERRER, M., AFSHAR-SHERIF, A.R., UWAMARIYA, C., CROMBRUGGHE, B., DAVIDSON, J.M., BHOWMICK, N.A. Dermal transforming growth factor-beta responsiveness mediates wound contraction and epithelial closure. *Am.J.Pathol* .v.176, n. 1, p.98– 107. Jan. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2797873/>>.

MARZOTTO, M., BONAFINI, C., OLIOSO, D., BARUZZI, A., BETTINETTI, L., DI LEVA, F., GALBIATI, E., BELLAVITE, P. *Arnica montana* Stimulates Extracellular Matrix Gene Expression in a Macrophage Cell Line Differentiated to Wound-Healing Phenotype. **PLOS ONE**. v.11, p.1-25 . Nov. 2016. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0166340>>.

MCLENNAN, S.V., MIN, D., YUE, D.K. Matrix metalloproteinases and their roles in poor wound healing in diabetes. **Wound Practice and Research**. v. 16, n. 3.p. 116-121. Ago.2008. Disponível em: <http://www.awma.com.au/journal/1603_02.pdf>.

MENDONÇA, R. J., NETTO, J.C. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 84, n. 3, p.257-262. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962009000300007>.

MIRA, A. C. M. **Fatores envolvidos na cronicidade das lesões cutâneas e na progressão da forma cutânea para a forma mucosa tardia da leishmaniose tegumentar americana.** 105f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2011.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, n.1/2, p.55-63, Dez. 1983. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>>.

MOTA, A. C. C., MOTTA, L. J., SANTOS, E. M., GUEDES, C. C., ALFAYA, T. A., BUSSADORI, S. K. Efeito citotóxico dos cimentos de ionômero de vidro em cultura celular. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**. v. 68, n.2, p. 166-169. Mai 2014. Disponível em: <<http://revodonto.bvsalud.org/pdf/apcd/v68n2/a16v68n2.pdf>>.

NAVARRO, V. P., NELSON-FILHO, P., SILVA, L. A. B., FREITAS, A. C. A participação das metaloproteínas da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. **Revista de Odontologia da UNESP**. v. 35, n. 4, p.233-238, 2006. Disponível em: <<http://revodontolunesp.com.br/files/v35n4/v35n4a02.pdf>>.

NISHIO, N.; ITO, S., SUZUKI, H., ISOBE, K.I. Antibodies to wounded tissue enhance cutaneous wound healing. **Immunology**, v. 128, n. 3, p. 369–380, Nov. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2770685/>>.

OLIVEIRA, C. C. **Alteração da expressão gênica e das respostas fisiológicas de macrófagos peritoneais de camundongos pelo Canova.** 118f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006.

OLIVEIRA, C. C., ABUD, A. P., OLIVEIRA, S. M., GUIMARÃES F.S, ANDRADE L.F., DI BERNARDI R.P., COLETTI E.L., KUCZERA D., LOZZO E.J., GONÇALVES J.P., TRINDADE E.S., BUCHI D.F. Developments on drug discovery and on new therapeutics: highly diluted tinctures act as biological response modifiers. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, p. 101- 111, Out. 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22029602>>.

OLIVEIRA, S.M. **Efeitos de medicamentos homeopáticos sobre a liberação de espécies reativas por macrófagos peritoneais e a expressão de marcadores de células de medula óssea de camundongos.** 172 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2010.

PARK, J.E., BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **The American Journal Surgery**. v.187, p.11-16. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15147986>>.

PETERSON, J.M., BARBUL, A., BRESLIN, R.J., WASSERKRUG, H.L., EFRON, G. Significance of T-lymphocytes in wound healing. **Surgery**. v. 102, n. 2, p. 300-305, Ago. 1987. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3497461>>.

QIAO, L., LU, S.L., DONG JY, SONG F. Abnormal regulation of neo-vascularisation in deep partial thickness scalds in rats with diabetes mellitus. **Burns**, v. 37, n. 6, p.1015-1022, Mar. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21641116>>.

REINKE, J. M., SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **European Surgical Research**. v. 49, p. 35-43. Mar. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22797712>>.

REPETTO, G., DEL PESO, A., ZURITA, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v.3 n. 7, p. 1125- 1131. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18600217>>.

ROBERTS, A. B., RUSSO, A., FELICI, A., FLANDERS, K. C. Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 995, p. 1-10. Mai. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12814934>>.

RUNDHAUG, J.E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **Journal cell molecular medicine**, v. 9, n. 2, p. 267-285, Jun. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15963249>>.

SANTORO, M. M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental cell research**, v. 304, n. 1, p. 274-286, Mar. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15707592>>.

SANTOS, F.C.A., ROCHEL-MAIA, S.S., FOCHI, R.A., JUSTULIN, L.A., SANTOS, S.A.A., VILAMAIOR, P.S.L., FELISBINO, S.L., GÓES, R.M., TABOGA, S.R. MMP-2 and MMP-9 localization and activity in the female prostate during estrous cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v. 173, n. 3, p. 419–427, Dez. 2011. Disponível em: <<http://www.pubpdf.com/pub/21767538/MMP-2-and-MMP-9-localization-and-activity-in-the-female-prostate-during-estrous-cycle>>.

SANTOS, V., MARQUES, J., SANTOS, A. S., CUNHA, B., MANIQUE, M. Abordagem de feridas estagnadas: estimular a epitelização. **Journal of aging e inovacion**, v.1, n. 2, p. 62-70, 2012. Disponível em: <https://issuu.com/aagi-id/docs/edi_o_completa_julho_de_2012>.

SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E., KAYNIG, V., LONGAIR, M., PIETZSCH, T., PREIBISCH, S., RUEDEN, C., SAALFELD, S., SCHMID, B., TINEVEZ, J. Y., WHITE, D.J., HARTENSTEIN, V., ELICEIRI, K., TOMANCAK, P., CARDONA, A. Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. **Nature Methods**. v. 9, n. 7, p. 1-15. Dez. 2013.

SERRANO I., MCDONALD P.C., LOCK F.E., DEDHAR S. Role Of The Integrin-Linked Kinase (ILK)/Rictor Complex In TGF-β1 Induced Epithelial Mesenchymal Transition (EMT). **Oncogene**, v.32, n.1, p. 50-60. Jan 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/221810700_Role_of_the_integrin-linked_kinase_ILKRictor_complex_in_TGFb-1-induced_epithelial-mesenchymal_transition_EMT>.

SILVA, F.S., ARAUJO, D. N., LIMA, J. P. M. S., REZENDE A. A, ABREU, B. J. G. A., DIAS, F. A. L. Enzymatic activity analysis of MMP-2 and 9 collected by swab from lower limb venous ulcers. **Jornal Vascular Brasileiro**. v. 13, n. 3, p. 229-234, Set. 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jvb/v13n3/1677-5449-jvb-13-03-0229.pdf>>.

SIMPSON, C. L., PATEL, D. M., GREEN, K. J., Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 12, p. 565-580, Set. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrm/journal/v12/n9/full/nrm3175.html>>.

THIRUVOTH, F. M., MOHAPATRA, D. P., SIVAKUMAR, D. K., CHITTORIA, R. K., NANDHAGOPAL V. Current concepts in the physiology of adult wound healing. **Plastic and aesthetic research**, V. 2, P.250-256, SET. 2015. Disponível em: <<http://parjournal.net/article/viewFile/1211/413>>.

TOTH, M.; FRIDMAN, R. Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin Zymography. **Methods in Molecular Medicine**, v. 57, p. 163–174. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21340898>>.

TOULON, A., BRETON, L., TAYLOR, K. R., TENENHAUS, M., BHAVSAR, D., LANIGAN, C., RUDOLPH, R., JAMESON, J., HAVRAN, W.L. A role for human skin-resident T cells in wound healing. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 206, n. 4, p. 743-750. Abr. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19307328>>.

TREDGET, E.E., YANG, L., DELEHANTY, M., SHANKOWSKY, H., SCOTT, P.G., Polarized Th2 cytokine production in patients with hypertrophic scar following thermal injury. **J. Interferon Cytokine Res.** v. 26, n. 3, p. 179–189, Mar. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16542140>>.

WANG, H., WANG, F., TAO, X., CHENG H., Ammonia-containing dimethyl sulfoxide: an improved solvent for the dissolution of formazan crystals in the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (mtt) assay. **Analytical biochemistry**, v. 421, n. 1, p. 324-326, Fev.2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22100715>>.

WAISSE, S. The science of high dilutions in historical context. **Homeopathy**. v. 101, n. 2, p.129-137. Abr. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1475491612000057>>.

WEISSGERBER, T. L., MILIC, N.M., WINHAM, S.J., GAROVIC, V.D. Beyond Bar and Line Graphs: Time for a New Data Presentation Paradigm. **PLOS Biology**. v. 13, n. 4, p.1 - 10, Abr. 2015. Disponível em : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25901488>>.

WERNER, S., GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol rev.** v. 83, n. 3 p.835–870, 2003. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843410>>.

WERNER, S., KRIEG T., SMOLA H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. **J. Invest. Dermatol.** v.127, n. 5, p. 998–1008. Mai. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17435785>>.

WICKETT, R. R., VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **American journal of infection control**. v. 34, n.10, p. 98-110. Dez. 2006. Disponível em: <[http://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553\(06\)00950-3/abstract](http://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553(06)00950-3/abstract)>.

WILGUS, T. A. Immune cells in the healing skin wound: Influential players at each stage of repair. **Pharmacological Research**, v. 58, p. 112-116, Ago. 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661808001369>>

WITTE, M. B., BARBUL, A. General Principles of Wound Healing. **Surgical Clinics of North America**. v. 77, n. 3, p. 509- 528. Jun. 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9194878>>.

YUE, P.Y., LEUNG, E.P., MAK, N.K., WONG, R.N. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. **Journal of Biomolecular Screening**. v. 15, n. 4, p. 427-433. Abr. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20208035>>.

ANEXOS

ANEXO 1 – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

TAMPÃO RIPA

- 50 mM Tris – HCl (pH – 8)
- 150 mM NaCl
- 0,1% SDS (Dodecilsulfato de sódio, Synth[®])
- 0,25% deoxicolato de sódio
- 4% CHAPS

OBS: 150 µL cocktail inibidor de proteases COMPLETE, MINI 7X (Roche, 04693124001) para cada 1mL de tampão ripa (Adicionar no tampão, somente quando for utilizar)

ANEXO 2 – PROTOCOLOS PARA WESTERN BLOTTING

TRIS-HCl 1,5M

1- REAGENTES

- Tris base (Amresco[®] - Cat.:0826)-----0,908 g
- HCl puro (Synth[®]. Cat.: A1028.01.BJ) -----592 µL
- H2O ultra pura (Biohuman[®]) -----4,4 mL

2- CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- Manter na geladeira
- pH 6,8 (medir o pH todas as vezes que a solução for utilizada)

TRIS-HCl 1,5M com SDS 0,4%**1- REAGENTES**

- Tris base (Amresco® - Cat.:0826) -----9,086 g
- SDS (Dodecilsulfato de sódio, Synth®)-----0,2 g
- HCl puro (Synth®. Cat.: A1028.01.BJ) -----1,07mL
- H2O ultra pura (Biohuman®) -----49 mL

2- CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- Manter na geladeira
- pH 8,8 (medir o pH todas as vezes que a solução for utilizada)

TRIS-HCl 0,5M com SDS 0,4%**1- REAGENTES**

- Tris base (Amresco® - Cat.:0826) -----3,029 g
- SDS (Dodecilsulfato de sódio, Synth®.)-----0,2 g
- HCl puro (Synth®. Cat.: A1028.01.BJ) -----1,97mL
- H2O ultra pura (Biohuman®) -----48 mL

2- CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- Manter na geladeira
- pH 6,8 (medir o pH todas as vezes que a solução for utilizada)

ACRILAMIDA 30%**1- REAGENTES**

- Acrilamida (Sigma®. Cat.: 01697)-----18,75mL
- Bis-acrilamida (Vetec®. Cat.: 1578) -----0,2g
- H2O ultra pura (Biohuman®) -----6,25mL

2- CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- Manter na geladeira

TAMPÃO DE AMOSTRA 5x []- não redutor**1- REAGENTES**

- Tris- HCl 1,5M (pH 6,8) -----1mL
- Glicerol (Vetec[®]. Cat.: 123) -----2,5 mL
- SDS(Dodecilsulfato de sódio, Synth[®].) -----0,5 g
- H₂O ultra pura (Biohuman[®])-----1,5 mL
- Azul de bromofenol (Vetec[®]. Cat.:202) -----0,2g

GEL de POLIACRILAMIDA 10% (Gel de separação)**1- REAGENTES**

- Acrilamida 30% -----4,95mL
- H₂O ultra pura (Biohuman[®])-----6,0 mL
- Tris 1,5M / SDS 0,4% (pH 8,8) -----3,75mL
- Temed (Amresco[®]. Cat.: 0761) -----15 µL
- APS -----150 µL

2- CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- Após colocar 5ml da solução, de cada lado, colocar lentamente 1mL de álcool metílico, de cada lado, para retirar as bolhas da superfície e esperar polimerizar. Após a polimerização, retirar o metanol e colocar o Gel de empilhamento.

GEL de POLIACRILAMIDA- 5% de acrilamida (Gel de empilhamento)**1- REAGENTES**

- Acrilamida 30% -----1,5mL
- H₂O ultra pura (Biohuman[®])-----6,36mL
- Tris 0,5M / SDS 0,4% (pH 6,8) -----1,14mL
- Temed (Amresco[®]. Cat.: 0761)-----9,1 µL
- APS -----91 µL

2- CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- Colocar 2 mL de gel de empilhamento de cada lado e colocar os pentes para formar os poços, onde as amostras serão inseridas. Esperar que o gel polimerize para retirar os pentes.

TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA 5x []

1- REAGENTES

- Glicina (Sigma® - Cat.: G8898)-----71,52 g
- Tris base (Amresco® - Cat.:0826) -----15 g
- HCl puro (Synth® - Cat.: A1028.01.BJ) ----- 4 mL
- H₂O ultra pura (Biohuman®)----- 1L

2- CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- Manter na geladeira
- pH 8,3 (medir o pH todas as vezes que a solução for utilizada)

TAMPÃO DE CORRIDA 1x []

1- REAGENTES

- Tampão de transferência 5x [] -----200 mL
- H₂O ultra pura (Biohuman®)-----800 mL
- SDS (Dodecilsulfato de sódio, Synth®.)-----1g

2- CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- Manter na geladeira
- pH 8,3 (medir o pH todas as vezes que a solução for utilizada)
- Utilizar no máximo 3 vezes a mesma solução.

TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA 1x []

1- REAGENTES

- Tampão de transferência 5x [] -----240 mL
- Metanol (Vetec® - Cat.: V003352) -----240 mL

- H₂O ultra pura (Biohuman[®])-----720 mL

2- CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- Manter na geladeira
- pH 8,3 (medir o pH todas as vezes que a solução for utilizada)
- Utilizar no máximo 3 vezes a mesma solução.

TBS 10x []

1- REAGENTES

- Tris Base (Amresco[®] - Cat.:0826) ----- 15,14g
 - NaCl (Vetec[®] - Cat.:106) -----43,83g
 - HCl puro (Synth[®] - Cat.: A1028.01.BJ)-----8,3 mL
 - H₂O ultra pura (Biohuman[®])-----491,7mL

2- CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- Manter na geladeira
- pH 7,5 (medir o pH todas as vezes que a solução for utilizada)

TBST 1x [] (Tris base -25Mm, NaCl- 150 mM, Tween 20- 0,1% v/v)

1- REAGENTES

- TBST 10x [] -----15mL
 - H₂O ultra pura (Biohuman[®]) -----135mL
 - Tween 20 (Vetec[®] - Cat.: 1280)-----150µL

2- CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- Manter na geladeira
- pH 7,5 (medir o pH todas as vezes que a solução for utilizada)

TBST/ 5% BSA 1x []**1- REAGENTES**

- TBST -----30mL
- BSA (Bovine serum albumin- Sigma®- Cat.: A9430) -----1,5g

2- CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

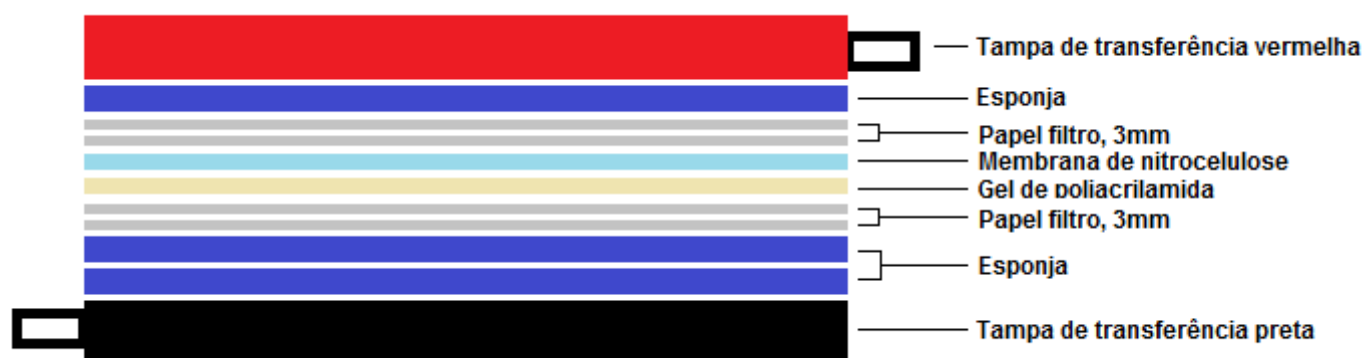
- Manter na geladeira
- Filtrar na primeira vez de uso da solução, para evitar manchas na membrana.

Ponceau -S 1x []**1- REAGENTES**

- Ponceau S -----0,2g
- Ácido acético -----10 mL
- H2O ultra -pura -----200mL

2- CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- Manter na geladeira

Esquema de Montagem da Transferência

FONTE: O autor (2016)

ANEXO 3 - PROTOCOLO DE IMUNOMARCAÇÃO DE MMP-2 PARA WESTERN BLOTTING

IMUNOMARCAÇÃO

Anticorpo: MMP-2 (C-19)

Marca e código: Santa cruz (SC-10736)

Produzido em : Rabbit

Temperatura de estoque: 4° C

Peso molecular da proteína: 63-72 kDa

1 – BLOQUEIO:

- Solução: TBST/ 5% BSA
- Duração: 1 hora
- temperatura: temperatura ambiente

2 – ANTICORPO PRIMÁRIO:

- Solução: TBST/5% BSA/0,1% azida sódica
- Diluição: 1:200
- Duração e Temperatura: “overnight” a 4 °C

3 – LAVAGEM :

- Solução: TBST
- Número de lavagens: 3
- Duração: 5 minutos

4 – ANTICORPO SECUNDÁRIO:

- Anticorpo: Goat anti-rabbit (SC- 2004)
- Solução: TBST/5% BSA
- Diluição: 1:3000
- Duração e Temperatura: 1 hora à temperatura ambiente

5 – LAVAGEM:

- Solução: TBST
- Número de lavagens: 3
- Duração: 10 segundos

6 – REVELAÇÃO:

- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34087) (reagentes misturados na proporção 1:1 na hora de usar)
- As membranas forma reveladas no aparelho Amersham™ Imager 600 da General Electric® (GE)

7- DESMARCAÇÃO

- H₂O: 5 minutos
- NaOH: 10 minutos
- H₂O: 5 minutos

ANEXO 4 -PROTOCOLO DE IMUNOMARCAÇÃO DE MMP-9 PARA WESTERN BLOTTING

IMUNOMARCAÇÃO

Anticorpo: MMP-9 (C-20)

Marca e código: Santa cruz (SC-6841)

Produzido em: Goat

Temperatura de estoque: 4° C

Peso molecular da proteína: 92 kDa

1 – BLOQUEIO:

- Solução: TBST/ 5% BSA
- Duração: 1 hora
- temperatura: temperatura ambiente

2 – ANTICORPO PRIMÁRIO:

- Solução: TBST/5% BSA/0,1% azida sódica
- Diluição: 1:200
- Duração e Temperatura: “overnight” a 4 °C

3 – LAVAGEM :

- Solução: TBST
- Número de lavagens: 3
- Duração: 5 minutos

4 – ANTICORPO SECUNDÁRIO:

- Anticorpo: Anti-goat (HRP@ goat- Invitrogen – Cat: 611620)
- Solução: TBST/5% BSA
- Diluição: 1:3000
- Duração e Temperatura: 1 hora à temperatura ambiente

5 – LAVAGEM:

- Solução: TBST
- Número de lavagens: 3
- Duração: 10 segundos

6 – REVELAÇÃO:

- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34087) (reagentes misturados na proporção 1:1 na hora de usar)
- As membranas forma reveladas no aparelho AmershamTM Imager 600 da General Electric® (GE)

7- DESMARCAÇÃO

- H₂O: 5 minutos
- NaOH: 10 minutos
- H₂O: 5 minutos

ANEXO 5 -PROTOCOLO DE IMUNOMARCAÇÃO DE A-SMA PARA WESTERN BLOTTING

IMUNOMARCAÇÃO

Anticorpo: α -SMA (do inglês, *alpha-Smooth Muscle Actin*)

Marca e código: Sigma –Aldrich A5228

Produzido em: Mouse

Temperatura de estoque: -20°C

Peso molecular da proteína: ~ 42kDa

1 – BLOQUEIO:

- Solução: TBST/ 5% BSA
- Duração: 1 hora
- temperatura: temperatura ambiente

2 – ANTICORPO PRIMÁRIO:

- Solução: TBST/5% BSA/0,1% azida sódica
- Diluição: 1:100
- Duração e Temperatura: “overnight” a 4 °C

3 – LAVAGEM :

- Solução: TBST
- Número de lavagens: 3
- Duração: 5 minutos

4 – ANTICORPO SECUNDÁRIO:

- Anticorpo: HRP- anti – mouse (BD,554002)
- Solução: TBST/5% BSA
- Diluição: 1:2000
- Duração e Temperatura: 1 hora à temperatura ambiente

5 – LAVAGEM:

- Solução: TBST
- Número de lavagens: 3
- Duração: 10 segundos

6 – REVELAÇÃO:

- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34087) (reagentes misturados na proporção 1:1 na hora de usar)
- As membranas forma reveladas no aparelho Amersham™ Imager 600 da General Electric® (GE)

7- DESMARCAÇÃO

- H₂O: 5 minutos
- NaOH: 10 minutos
- H₂O: 5 minutos

ANEXO 6 - PROTOCOLO DE IMUNOMARCAÇÃO DE VEGF PARA WESTERN BLOTTING

IMUNOMARCAÇÃO

Anticorpo: VEGF

Marca e código: Santa cruz (SC- 1876)

Produzido em: Mouse

Temperatura de estoque: 4° C

Peso molecular da proteína: 50-55 kDa

1 – BLOQUEIO:

- Solução: TBST/ 5% BSA
- Duração: 1hora
- temperatura: temperatura ambiente

2 – ANTICORPO PRIMÁRIO:

- Solução: TBST/5% BSA/0,1% azida sódica
- Diluição: 1:200
- Duração e Temperatura: 1hora em temperatura ambiente.

3 – LAVAGEM :

- Solução: TBST
- Número de lavagens: 3
- Duração: 5 minutos

4 – ANTICORPO SECUNDÁRIO:

- Anticorpo: HRP- anti – mouse (BD,554002)
- Solução: TBST/5% BSA
- Diluição: 1:2000
- Duração e Temperatura: 1 hora à temperatura ambiente

5 – LAVAGEM:

- Solução: TBST
- Número de lavagens: 3
- Duração: 10 segundos

6 – REVELAÇÃO:

- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34087) (reagentes misturados na proporção 1:1 na hora de usar)
- As membranas forma reveladas no aparelho Amersham™ Imager 600 da General Electric® (GE)

7- DESMARCAÇÃO

- H₂O: 5 minutos
- NaOH: 10 minutos
- H₂O: 5 minutos

ANEXO 7- PROTOCOLO DE IMUNOMARCAÇÃO DE ACTINA PARA WESTERN BLOTTING

IMUNOMARCAÇÃO

Anticorpo: Actina (I-19)

Marca e código: Santa cruz (SC- 1616)

Produzido em : Goat

Temperatura de estoque: 4° C

Peso molecular da proteína: 43kDa

1 – BLOQUEIO:

- Solução: TBST/ 5% BSA
- Duração: 1hora
- temperatura: temperatura ambiente

2 – ANTICORPO PRIMÁRIO:

- Solução: TBST/5% BSA/0,1% azida sódica
- Diluição: 1:100
- Duração e Temperatura: 1hora em temperatura ambiente.

3 – LAVAGEM :

- Solução: TBST
- Número de lavagens: 3
- Duração: 5 minutos

4 – ANTICORPO SECUNDÁRIO:

- Anticorpo: Anti-goat (HRP@ goat- Invitrogen – Cat: 611620)
- Solução: TBST/5% BSA
- Diluição: 1:3000
- Duração e Temperatura: 1 hora à temperatura ambiente

5 – LAVAGEM:

- Solução: TBST
- Número de lavagens: 3
- Duração: 10 segundos

6 – REVELAÇÃO:

- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34087) (reagentes misturados na proporção 1:1 na hora de usar)
- As membranas forma reveladas no aparelho Amersham™ Imager 600 da General Electric® (GE)

7- DESMARCAÇÃO

- H₂O: 5 minutos
- NaOH: 10 minutos
- H₂O: 5 minutos

ANEXO 8 -PROTOCOLO DE IMUNOMARCAÇÃO DE A-TUBULINA PARA WESTERN BLOTTING

IMUNOMARCAÇÃO

Anticorpo: α - Tubulina

Marca e código: Invitrogen (MA1-25062)

Produzido em : Mouse

Temperatura de estoque: -20° C

Peso molecular da proteína: 50-55 kDa

1 – BLOQUEIO:

- Solução: TBST/ 5% BSA
- Duração: 1 hora
- temperatura: temperatura ambiente

2 – ANTICORPO PRIMÁRIO:

- Solução: TBST/5% BSA/0,1% azida sódica
- Diluição: 1:200
- Duração e Temperatura: “overnight” a 4 °C

3 – LAVAGEM :

- Solução: TBST
- Número de lavagens: 3
- Duração: 5 minutos

4 – ANTICORPO SECUNDÁRIO:

- Anticorpo: HRP-anti-mouse (BD, 554002)
- Solução: TBST/5% BSA
- Diluição: 1:2000
- Duração e Temperatura: 1 hora à temperatura ambiente

5 – LAVAGEM:

- Solução: TBST
- Número de lavagens: 3
- Duração: 10 segundos

6 – REVELAÇÃO:

- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34087) (reagentes misturados na proporção 1:1 na hora de usar)
- As membranas forma reveladas no aparelho Amersham™ Imager 600 da General Electric® (GE)

7- DESMARCAÇÃO

- H₂O: 5 minutos
- NaOH: 10 minutos
- H₂O: 5 minutos

ANEXO 9 - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO CEUA/UFPR



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 694

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.020996/2013-24

APROVADO: 20/06/2013 – R.O. 05/2013

TÍTULO: Ação de complexos naturais altamente diluídos no processo de cicatrização de feridas na pele em camundongos

AUTORES: Dorly de Freitas Buchi, Carolina Camargo de Oliveira, Jenifer Pendiuk Gonçalves, Fernando Fortunato Jeronimo, Daniela Moraes Leme, Divino Martins de Oliveira Junior

DEPARTAMENTO: Biologia Celular


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador da CEUA